

Aus der
Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik;
Innere Medizin der Kleintiere und
Klinische Laboratoriumsdiagnostik

und dem
Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die Bedeutung von Entzündungszellen und
Zytokinen für die Regression des kaninen
kutanen Histiozytoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Ute Kaim

Gießen 2003

Aus der
Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik;
Innere Medizin der Kleintiere und
Klinische Laboratoriumsdiagnostik
Betreuer: HDoz Dr. A. Moritz

und dem
Institut für Veterinär-Pathologie
Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die Bedeutung von Entzündungszellen und
Zytokinen für die Regression des kaninen
kutanen Histiozytoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Ute Kaim
Tierärztin aus Frankfurt
Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: HDoz Dr. A. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Baumgärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Das kanine kutane Histiozytom	3
2.1.1	Histogenese	3
2.1.2	Klinik und makroskopisches Bild	5
2.1.3	Histologie	6
2.1.4	Spontanregression des kaninen kutanen Histiozytoms	7
2.2	Andere histiozytäre Hauttumoren des Hundes	9
2.2.1	Kutane Histiozytose und systemische Histiozytose	9
2.2.2	Maligne Histiozytose und lokalisiertes histiozytäres Sarkom	10
2.2.3	Malignes fibröse Histiozytom	12
2.2.4	Benignes fibröses Histiozytom	13
2.2.5	Xanthom	13
2.3	Immunantwort gegen Tumoren	14
2.3.1	Effektorzellen der Immunantwort	14
2.3.1.1	CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten	14
2.3.1.2	CD4+ T-Helferzellen	15
2.3.1.3	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	16
2.3.1.4	Makrophagen	17
2.3.1.5	Dendritische Antigen-präsentierenden Zellen	17
2.3.1.6	Zytokine	18
2.3.2	Grenzen der Tumorimmunität	22
2.4	Spontanregression natürlich auftretender Tumoren der Haussäugetiere	24
2.4.1	Übertragbarer Venerischer Tumor	24
2.4.2	Melanom des Sinclair-Miniaturschweines	25
2.4.3	Papillom	25
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Untersuchte Hunde	27
3.2	Gewebeproben für die Histologie, Immunhistologie und RT-PCR	29
3.2.1	Herstellung der Gefrierblöcke und Paraffinblöcke	29
3.2.2	Herstellung der Gefrierschnitte und Paraffinschnitte	30
3.3	Lichtmikroskopische Gruppeneinteilung der Histiozytome	30

3.4	Immunhistologie	31
3.4.1	Antikörper und Seren.....	31
3.4.2	Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) zum Nachweis der Lymphozyten-spezifischen Antigene im Gefrierschnitt	33
3.4.3	Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) zum Nachweis von Lysozym im Paraffinschnitt	35
3.4.4	Protokoll der Immunhistologie (PAP-Methode) zum Nachweis des myeloischen/histiozytären Antigens im Paraffinschnitt	36
3.4.5	Kontrollen	36
3.4.6	Auswertung der Immunhistologie	36
3.5	„Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling“- (TUNEL) Methode für den Nachweis von apoptotischen Zellen	37
3.6	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.6.1	Allgemeine Maßnahmen.....	39
3.6.2	RNA-Isolierung	40
3.6.3	DNase-Behandlung	42
3.6.4	Reverse Transkription.....	43
3.6.5	Konventionelle PCR zur Überprüfung der RNA-Isolierung	44
3.6.6	Semiquantitative Echtzeit-PCR zum Nachweis der Zytokin und iNOS mRNA-Expression	45
3.6.6.1	Primer	46
3.6.6.2	Temperaturbedingungen und Messpunkte	49
3.6.6.3	Positivkontrollen und Standardreihen	51
3.6.6.4	Auswertung der Light Cycler PCR.....	52
3.6.7	Gelelektrophorese	54
3.7	Statistische Auswertung	54
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Kennzeichen der untersuchten Hunde, Makroskopie der Tumoren und Ergebnisse der Blutuntersuchung.....	56
4.2	Gruppenzuordnung der Histiozytome	58
4.3	Histologisches Bild der Histiozytome	59
4.4	Immunhistologischer Nachweis der Lymphozytendifferenzierungsantigene an Gefrierschnitten.....	63
4.4.1	CD3ε- und CD21(like)-positive Zellen.....	63
4.4.2	CD4- und CD8-positive Zellen	66

4.4.3	Kontrolltiere	70
4.5	Immunhistologischer Nachweis von Lysozym und myeloischem/histiozytärem Antigen (MAC 387)	70
4.5.1	Lysozym-positive Zellen	70
4.5.2	MAC 387-positive Zellen.....	72
4.5.3	Kontrolltiere	75
4.6	Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode	75
4.7	Nachweis der Zytokin und iNOS mRNA-Expression	77
4.7.1	Histiozytome	79
4.7.2	Kontrolltiere	84
5	DISKUSSION	85
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	104
7	SUMMARY	106
8	LITERATURVERZEICHNIS	108
9	ANHANG	122
9.1	Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Antikörper	122
9.2	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel	124
9.3	Lösungen und Puffer	126
9.3.1	Immunhistologie und TUNEL-Methode.....	126
9.3.2	RNA-Isolierung und RT-PCR.....	127
9.4	Abkürzungen	128

1 EINLEITUNG

Gegenstand der Arbeit sind Untersuchungen zur Pathogenese der spontanen Regression des kaninen kutanen Histiozytoms. Es handelt sich dabei um einen schnell wachsenden, meist solitär auftretenden Hauttumor, der in aktuellen Tumorklassifikationen den benignen histiozytären Tumoren zugeordnet wird (HENDRICK et al. 1998). Das Histiozytom ist einer der häufigsten kaninen Tumoren, wobei insbesondere junge Hunde betroffen sind (TAYLOR 1969; FRESE 1989). Als Ursprungszellen wurden die Langerhans-Zellen der Haut, die zu der Reihe der dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen gehören, identifiziert (MOORE et al. 1996; MARCHAL et al. 1995). Eine Besonderheit des Histiozytoms besteht darin, daß es sich in der Regel spontan zurückbildet. Diese Regression geht mit einer fortschreitenden lymphozytären Infiltration der Tumormasse einher, die letztendlich zur Elimination der Tumorzellen führt (COCKERELL und SLAUSON 1979). Obwohl das Histiozytom eines der wenigen natürlichen Modelle für die Spontanregression von Tumoren darstellt, ist bisher nur wenig über die immunologischen Vorgänge bei diesem Prozeß bekannt. In einer immunhistologischen Studie wurden die Tumor infiltrierenden Lymphozyten als vorwiegend CD8+ T-Zellen beschrieben (MOORE 1996). Weiterhin konnte beobachtet werden, daß es im Verlauf der Rückbildung des Histiozytoms zu einer vermehrten Expression von MHC II-Molekülen kommt, was als möglicher Auslöser der Tumorregression in Form einer verstärkten Antigenpräsentation durch die Tumorzelle interpretiert wurde (KIPAR et al. 1998).

Obwohl zahlreiche Tumoren Neoantigene exprimieren, kommt es meist nicht zu einer effektiven Immunantwort, die zur Elimination der Tumorzellen führt. Man geht davon aus, dass für die erfolgreiche Induktion einer Tumor-spezifischen Immunität eine Antigenpräsentation in Verbindung mit adäquaten pro-inflammatorischen Stimuli notwendig ist (PARDOLL 2001). Dabei spielen Antigen-präsentierenden Zellen, zu denen auch die Ursprungszellen des Histiozytoms gehören, vermutlich eine besondere Rolle, da sie Antigene in Verbindung mit geeigneten co-stimulatorischen Molekülen exprimieren, die zur Induktion einer effektiven Immunantwort notwendig sind. Außerdem tragen Zytokine, insbesondere Th1-Zytokine, maßgeblich zur

Proliferation und Aktivierung von zytotoxischen Effektorzellen bei (FOSS 2002). Welchen zytotoxischen Effektormechanismen bei der Abwehr von Tumoren die größte Bedeutung zukommt und welche Effektormechanismen sich zur Entwicklung von therapeutischen Strategien eignen, ist immer noch unklar (DRAKE und PARDOLL 2002). Zum einen kommt der T-Zell vermittelten spezifischen Immunantwort, durch ihren direkten zytotoxischen Effekt aber auch durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, eine wichtige Bedeutung zu (TODRYK 2000). Zum anderen können aktivierte Makrophagen und NK-Zellen als Zellen der angeborenen Immunität einen inhibitorischen Effekt auf das Tumorstadium ausüben (LONG 2002; BINGLE et al. 2002). Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass entzündliche Vorgänge im Umfeld eine Progression des Tumors hervorrufen können (COUSSENS and WERB 2000).

Da Kenntnisse über Mechanismen, die der Spontanregression natürlich auftretender Neoplasien zu Grunde liegen, unter Umständen zum besseren Verständnis der Tumorummunität führen können, sollte in dieser Arbeit ein Beitrag zur Beschreibung der Immunantwort bei der Regression des kaninen kutanen Histiozytoms geleistet werden. Ziel war es mittels RT-PCR festzustellen, ob die Regression des Histiozytoms durch die Expression eines spezifischen Zytokinmusters im Tumorgewebe gekennzeichnet ist und ob die Expression dieser Zytokine mit dem Auftreten bestimmter, immunhistologisch differenzierbarer Zellpopulationen assoziiert ist. Weiterhin sollte ermittelt werden, inwieweit die Synthese von Stickoxid und die Tumorzell-Apoptose eine Rolle bei der Tumorrepression spielen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das kanine kutane Histiozytom

2.1.1 Histogenese

Das kanine kutane Histiozytom wird in der aktuellen WHO-Klassifikation der mesenchymalen Hauttumoren den benignen histiozytären Tumoren zugeordnet (HENDRICK et al. 1998). In einer Einteilung der Neoplasien des Hundes aus dem Jahre 1949 wurde es erstmals als Histiozytom benannt (MULLIGAN), aber auf Grund des ähnlichen lichtmikroskopischen Bildes zunächst als eine extragenitale Variante des transmissiblen venerischen Tumors dargestellt. Die von MOULTON 1961 vorgenommene Klassifizierung als eigenständiger Tumor wurde durch vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen und durch die Unterschiede im biologischen Verhalten bestätigt (DROMMER und SCHULZ 1969). Zudem konnte als wesentliches Unterscheidungsmerkmal zum transmissiblen venerischen Tumor gezeigt werden, dass die neoplastischen Zellen des Histiozytoms den regulären kaninen Chromosomensatz aufweisen (SMITH und JONES 1966). In weiteren elektronenmikroskopischen und histochemischen Studien zur Histogenese des Tumors wurde bestätigt, dass die neoplastischen Zellen histiozytären Ursprungs sind und in Beziehung zum mononukleären phagozytären System (MPS) stehen, allerdings widersprach man sich in der Frage, ob die Zellen Merkmale aktiver Phagozytose aufweisen (GLICK et al. 1976; KELLY 1970). Durch die Methode der Immunphänotypisierung wurde eine weitere Differenzierung der histiozytären Zellen in Subpopulationen von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen möglich, die sich durch ihre Lokalisation und die Expression spezifischer Antigene unterscheiden lassen. Zur genaueren Charakterisierung der Histiozytomzellen führten MOORE et al. (1996) immunhistologische Untersuchungen durch und konnten so an Hand der Expression von CD1- und spezifischen β 2-Intergrinmolekülen eine Verwandtschaft zu den epidermalen dendritischen Zellen der Haut, den sogenannten Langerhans-Zellen, darstellen. Sie gehören, neben den

dermalen perivaskulären dendritischen Zellen und den dendritischen Zellen der regionären Lymphknoten, zu den Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen des Haut-assoziierten Immunsystems (AFFOLTER 2000). Beim Hund sind sie vor allem durch die Lokalisation in der Epidermis und die Expression des Haupt-Histokompatibilitäts-Antigens Klasse-II (MHC II) und der Leukozytenantigene CD11c und CD1a, CD1b und CD1c in Verbindung mit fehlender Expression von CD4 und CD90 (Thy1) gekennzeichnet (MOORE et al. 1996). Bei den Langerhans-Zellen der Haut handelt es sich um unreife dendrititische Zellen, die in der Epidermis angesiedelt sind und nach Antigenaufnahme eine Migration durch Lymphgefäße der Haut zu dem regionären Lymphknoten beginnen. Während dieser Wanderung durchlaufen sie eine Reifung, die in einer erhöhten Expression von MHC II und co-stimulatorischen Molekülen resultiert und sie dort zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen macht (BANCHEREAU und STEINMAN 1998). Dendritische Zellen gehen, wie Monozyten und Makrophagen, von einem gemeinsamen CD34+ Vorläufer im Knochenmark aus. Sie sind in gewissem Maße zur Phagozytose befähigt, dienen aber vor allem als Antigen-präsentierende Zellen. Sie verarbeiten und präsentieren Proteine und Glykolipide und interagieren mit CD4+ -, CD8+ - und naiven T-Lymphozyten bei der Entstehung der spezifischen, erworbenen Immunität (HART 1997). Da reife dendritische Zellen viele costimulatorische Moleküle exprimieren, rufen sie unter den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen die effektivste T-Zell-Antwort hervor (GIROLOMONI und RICCIARDI-CASTOGNOLI 1997). Als Bestätigung der Hypothese, daß es sich bei den Langerhans-Zellen der Haut um die Ursprungszellen des Histiozytoms handelt entdeckten MARCHAL et al. (1995) in einer elektronenmikroskopischen Studie ultrastrukturelle Merkmale bei Histiozytomzellen, wie regelmäßige laminäre Strukturen, pleomorphe Einschlüsse und parakristalline Strukturen, die auch bei humanen Langerhans-Zellen vorkommen. Ultrastrukturelle Untersuchungen von MOORE und MARIASSY (1986) und MUNELL (1986) zeigten, dass die bei Mensch und Nager charakteristischen Birbeck-Granula in den Langerhanszellen des Hundes physiologischerweise nicht vorliegen. Dem zu Folge widerspricht das Fehlen von Birbeck-Granula in den Zellen des kaninen kutanen Histiozytoms nicht, wie zunächst angenommen, dem Langerhanszellursprung dieses Tumors. Eine weitere Immunophänotypisierung von

Histiozytomzellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie (BAINES et al. 2000) zeigte eine Expression von CD1a, CD1c, CD11a, CD11c, CD18, CD45, CD45R, MHC II, MHC I, und E- Cadherin. Dieses Expressionsmuster bestätigt den Langerhanszellursprung des Histiozytoms. Weiterhin wurde die Expression von CD1b, CD11b, CD44, CD49d und ICAM-1 festgestellt, was für einen aktivierten Phänotyp spricht. Die Annahme, daß es sich beim kutanen Histiozytom nicht um eine echte Neoplasie, sondern um eine reaktive Hyperplasie handelt wird immer wieder geäußert (SCOTT et al. 2001). Es gelang jedoch bislang nicht Viren oder andere Einschlüsse in den Histiozytomzellen nachzuweisen (KELM 1982). Ein Test für die Klonalität dendritischer Antigen-präsentierender Zellen, mit dessen Hilfe die neoplastische Natur des kutanen kaninen Histiozytoms letztlich erwiesen werden könnte, ist zur Zeit für den Hund nicht vorhanden (AFFOLTER 1998).

2.1.2 Klinik und makroskopisches Bild

Das Histiozytom gehört zu den häufigsten Tumoren des Hundes (FRESE et al. 1989), nach Untersuchungen von GEISEL (1987) und WALTER et al. (1997) waren 14,3% von 3071 bzw. 8,56% von 1140 untersuchten Hauttumoren Histiozytome. Im Gegensatz zu den meisten anderen Neoplasien tritt das Histiozytom vor allem bei jungen Hunden auf. In mehreren Studien betrafen über 50% der Fälle Tiere, die jünger als zwei Jahre alt waren (FRESE et al. 1989; TAYLOR et al. 1969; WEBER 1985). KIPAR (1994) führte vergleichende Untersuchungen über die seltener auftretenden Histiozytome beim älteren Hund mit einem Alter von 4 bis 14 Jahren und die Histiozytome beim jungen Hund unter 2 Jahren durch. Dabei konnten zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich des biologischen Verhaltens, der Morphologie und der immunhistologischen Eigenschaften festgestellt werden. Die Angaben zur Rassedisposition variieren, neben anderen Rassen wurden Histiozytome häufig bei Boxern, Dackeln und Cocker Spaniern beobachtet (TAYLOR et al. 1969; FRESE et al. 1989; KELM 1982). Eine signifikante Geschlechtsdisposition ist nicht bekannt, in mehreren Studien waren jedoch in der Mehrzahl männliche Tiere betroffen (KIPAR 1994; TAYLOR et al. 1969; KELM 1982). Als typische Lokalisation des Histiozytoms werden von den meisten Autoren

der Kopf, die Ohrmuscheln und die Gliedmaßen genannt. (FRESE et al. 1989; GEISEL 1987; TAYLOR et al. 1969). Makroskopisch stellt sich das Histiozytom als erhabene, haarlose, leicht erythematöse Hautläsion mit einem Durchmesser von etwa 0,2-3 cm dar. Die Schnittfläche ist von homogener grau-weißer Farbe und die Oberfläche ist häufig ulzeriert (FRESE et al. 1989; GEISEL 1987; KIPAR 1994). Die schnell wachsenden Histiozytome treten bis auf wenige Ausnahmen solitär (518 von 520 Fällen) auf und Rezidiven (3 von 520 Fällen) werden nur selten beobachtet. In der Regel kommt es nach einigen Wochen zur spontanen Rückbildung des Tumors (TAYLOR et al. 1969). Bislang ging man davon aus, daß eine Metastasierung des Histiozytoms nicht vorkommt (FRESE et al. 1989; TAYLOR et al. 1969). In den letzten Jahren wurden allerdings gehäuft Fälle von multiplen Histiozytomen beobachtet, die insbesondere bei der Rasse Shar Pei vorkommen. Diese Tumoren neigen zur Persistenz und gehen häufiger mit einer Lymphadenopathie der regionären Lymphknoten einher. In einigen Fällen konnte eine Migration von Tumorzellen in den Lymphknoten nachgewiesen werden. Es soll sogar in Ausnahmen zu malignem Verhalten mit Metastasen in inneren Organen gekommen sein (MOORE et al. 1996; AFFOLTER 1998; WELLE 2002).

2.1.3 Histologie

Im lichtmikroskopischen Bild des Histiozytoms zeigt sich eine Infiltration der Kutis mit leicht pleomorphen Rundzellen, die in Strängen und Zelllagen angeordnet sind und vom dermo-epidermalen Übergang bis in die tiefe Dermis und das subkutane Fettgewebe reichen (HENDRICK et al. 1998). Die Tumormasse ist gegenüber dem umliegenden Gewebe gut abgegrenzt und besitzt keine Kapsel (TAYLOR et al. 1969). Im Tumorgewebe ist kaum Stroma vorhanden und die adnexalen Strukturen der Haut sind fast vollständig verdrängt (HENDRICK et al. 1998). Die Makrophagen-ähnlichen neoplastischen Zellen besitzen runde bis ovale, blasse Kerne, die teilweise durch eine seitliche Einkerbung eine bohnenartige Form aufweisen. Das Zytoplasma ist leicht eosinophil und unscharf begrenzt. Mitosen sind zahlreich vorhanden (KELLY 1970; GLICK et al. 1976; HENDRICK et al. 1998). In einigen Tumoren sollen neoplastische Zellhaufen die Epidermis infiltrieren und so die

sogenannten Pautrierschen Mikroabzesse des kutanen Lymphosarkoms vortäuschen (HENDRICK et al. 1998). Bei ulzerierten Tumoren ist meist eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Bereich der Tumoroberfläche zu sehen (COCKERELL und SLAUSON 1979). Weiterhin finden sich, besonders an der Tumorbasis, in unterschiedlich starker Ausprägung Herde mit zahlreichen reifen Lymphozyten und vereinzelt Plasmazellen. Nach Angaben von COCKERELL und SLAUSON (1979) sind in Verbindung mit den herdförmigen lymphozytären Infiltraten nekrotische Foci im Tumorgewebe vorhanden.

2.1.4 Spontanregression des kaninen kutanen Histiozytoms

Eine Besonderheit des Histiozytoms besteht in der Tatsache, dass es zu den wenigen natürlich auftretenden Tumoren gehört, bei denen eine spontane Regression eintritt. Über die Mechanismen, die diesem Vorgang zu Grunde liegen, ist jedoch wenig bekannt. Um zu dokumentieren, wie die fortschreitende lymphozytäre Infiltration zur Regression des Histiozytoms führt, nahmen COCKERELL und SLAUSON (1979) eine Gruppeneinteilung der Histiozytome nach Menge und Muster der lymphozytären Infiltrate vor. Mit zunehmender Anzahl der Lymphozyten reichte die Einteilung von Gruppe 1, in der keine oder nur eine geringgradige diffuse lymphozytäre Infiltration in der Peripherie des Tumors vorhanden war, bis zu Gruppe 4, in der sich noduläre lymphozytäre Infiltrate von der Tiefe des Tumors bis an die epitheliale Oberfläche erstreckten und die lymphozytäre gegenüber der histiozytären Zellpopulation überwog. Die Autoren beobachteten mit steigender Gruppennummer eine Zunahme von nekrotischen Foci und degenerativen Zellveränderungen im Tumorgewebe und schlussfolgerten, dass die lymphozytären Infiltrate ein morphologischer Ausdruck der Immunantwort gegen Tumoren sind. In einer immunhistologischen Studie zeigten MOORE et al. (1996), dass die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten den T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$ und CD3 exprimierten und fast ausschließlich der Subpopulation der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen angehörten. CD4⁺ T-Helferzellen sowie B-Lymphozyten (CD21⁺ und CD79a⁺) waren nur in geringem Maße vorhanden. Die Autoren schlossen daraus, dass die Tumorregression von zytotoxischen T-Zellen vermittelt wird und vermuteten,

dass die Aktivierung dieser Effektorzellen durch eine Migration von Tumorzellen in den regionären Lymphknoten verursacht werden könnte. Dort angesiedelte Antigen-präsentierende Zellen und CD4+ T-Zellen könnten eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen über exogenes IL-2 hervorrufen. Als zweite Möglichkeit zogen die Autoren in Betracht, dass die Tumorzellen durch Aufregulation von costimulatorischen Molekülen der B7-Familie eine direkte Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen hervorrufen. KIPAR et al. (1998) untersuchten die MHC II-Expression in Histiozytomen mit unterschiedlich starker lymphozytärer Infiltration und beobachteten dabei überwiegend eine fokale juxtanukleäre zytoplasmatische MHC II-Expression bei Tumoren, die nur eine geringgradige diffuse Infiltration mit Lymphozyten aufwiesen. Tumoren hingegen bei denen eine disseminierte noduläre lymphozytäre Infiltration vorlag, zeigten eine vermehrte MHC II-Expression entlang der Zellperipherie. Dieses Verteilungsmuster wurde so interpretiert, dass in der erstgenannten Gruppe neu synthetisierte MHC II-Moleküle in Vesikeln gespeichert vorliegen und in der zweiten Gruppe eine Akkumulation von MHC II-Molekülen entlang der Plasmamembran statt gefunden hat. Diese vermehrte Expression von MHC II auf der Tumorzelloberfläche bei stärker infiltrierten Histiozytomen könnte eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Tumorregression spielen. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (BAINES et al. 2000) wurde festgestellt, dass Tumorzellen, die aus Histiozytomen im frühen, proliferativen Stadium isoliert wurden eine niedrigere Expression von MHC I, MHC II und ICAM-1 sowie eine höhere Expression von E-Cadherin zeigten als Tumorzellen aus älteren Histiozytomen mit lymphozytären Infiltraten. Diese Unterschiede gleichen den phänotypischen Veränderungen, die während der Reifung und Migration von Langerhans-Zellen stattfinden. Weiterhin induzierten Histiozytomzellen aus älteren Läsionen mit lymphozytären Infiltraten eine stärkere Proliferation von autologen PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) als Zellen aus frühen Läsionen, was ebenfalls für eine Reifung der Histiozytomzellen im Verlauf der Tumorprogression spricht. Histiozytomzellen aus späten Läsionen zeigten allerdings auch eine höhere Rate an Makropinozytose, eine Fähigkeit, die normalerweise im Verlauf der Reifung von dendritischen Zellen verloren geht.

2.2 Andere histiozytäre Hauttumoren des Hundes

In der aktuellen WHO-Klassifikation aus dem Jahre 1998 werden unter den histiozytären Tumoren bzw. Tumor-artigen Läsionen als benige Tumoren das kanine kutane Histiozytom und das Xanthom genannt und als maligner Tumor die maligne Histiozytose aufgeführt. Die kutane und die systemische Histiozytose werden als intermediäre Formen bezeichnet. Das maligne fibröse Histiozytom gilt nicht als histiozytärer Tumor, sondern wird den Tumoren des Bindegewebes zugeordnet (HENDRICK et al. 1998). In der aktuellen Literatur finden sich jedoch Abweichungen von dieser Einteilung und zur Zeit variiert die Zurordnung bzw. die Bezeichnungen der histiozytären Tumoren. Ein Grund für diese Vielfalt ist, dass einige dieser Erkrankungen klinisch und histologisch nur schwer voneinander abgrenzbar sind und die Etablierung von immunhistologischen Markern zur Differenzierung der Ursprungszellen noch nicht abgeschlossen ist.

2.2.1 Kutane Histiozytose und systemische Histiozytose

Basierend auf den Untersuchungen von AFFOLTER und MOORE (2000) ist die Annahme weit verbreitet, dass es sich bei der kutanen und systemischen Histiozytose nicht um Neoplasien sondern um eine reaktive Proliferationen von dermalen dendritischer Zellen handelt. Beide Erkrankungen zeigen primär Läsionen in der Haut und Unterhaut und treten bei Hunden mittleren Alters auf. Es treten bei beiden Krankheitsbildern multiple, teils konfluierende Knoten auf, die oft haarlos oder ulzeriert sind. Prädilektionstellen sind der Kopf, insbesondere das Planum nasale, der Perinealbereich, das Skrotum und die Extremitäten. (JACOBS et al. 2002) Die Veränderung sind primär nicht schmerzhaft oder juckend und können zunächst vollständige oder partielle Regression zeigen, allerdings kommt es wieder zur Ausbildung neuer Knoten (AFFOLTER 1998). Das histologische Bild beider Krankheiten ist identisch. Es finden sich dermale und subkutane Infiltrationsherde mit zahlreichen histiozytären Zellen und variablen Mengen von Lymphozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Die Infiltrate können eine angiozentrische Anordnung aufweisen und stellenweise infiltrieren die histiozytären

Zellen die Gefäßwände und rufen Thrombosen und ischämische Nekrosen hervor (AFFOLTER 1998; SCOTT et al. 2001). Der Phänotyp der infiltrierenden Zellen entspricht dem aktivierter dendritischer Antigen-präsentierender Zellen. Als wesentliches Unterscheidungsmerkmal zum kaninen kutanen Histiozytom sind die Zellen der kutanen und der systemischen Histiozytose CD4 und CD90 (Thy-1) positiv. (AFFOLTER und MOORE, 2000). Eine Besonderheit der systemischen Histiozytose ist, dass diese Erkrankung vor allem beim Berner Sennenhund auftritt (MOORE 1984). Für die kutane Histiozytose hingegen ist keine Rassedisposition bekannt. Der wichtigste Unterschied der systemischen Histiozytose gegenüber der kutanen Form besteht jedoch darin, dass bei diesem Krankheitsbild Läsionen in weiteren Organen auftreten. Dabei sind besonders Nasenschleimhaut, Augen, Lunge, Milz, Leber und Knochenmark betroffen. Es kommt zudem bei der systemischen Histiozytose zu einer generalisierten Lymphadenopathie, die bei der kutanen Histiozytose meist lokalisiert bleibt (AFFOLTER 1998; GOLDSCHMIDT und HENDRICK 2002). Wesentliche Unterscheidungsmerkmale dieser vermutlich reaktiven Proliferation zur malignen Histiozytose, die eine hochgradig maligne Neoplasie darstellt, sind die fehlende Atypie der histiozytären Zellenpopulation und der weniger rapide verlaufende klinische Verfall der Patienten. Die Ätiologie und Pathogenese der kutanen und systemischen Histiozytosen sind unklar. Eine infektiöse Krankheitsursache konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Da Patienten mit kutaner Histiozytose auf eine immunsuppressive Therapie ansprechen, kommt eine Dysregulation des Immunsystems als Erkrankungsursache in Frage. (AFFOLTER und MOORE 2000)

2.2.2 Maligne Histiozytose und lokalisiertes histiozytäres Sarkom

Die maligne Histiozytose ist ein multizentrischer hochgradig maligner Rundzelltumor, der zuerst beim Berner Sennenhund beschrieben wurde. Bei dieser Rasse kam es zu familiär gehäuftem Auftreten der Erkrankung (MOORE 1986). Der Tumor kommt bei Tieren im Alter von 3-11 Jahren vor und betrifft am häufigsten Milz, Lunge, Knochenmark, Leber und Lymphknoten. In fortgeschrittenen Stadien können weitere Organe betroffen sein (AFFOLTER 1998). Die Manifestation in der Haut ist selten

und äußert sich in Form von multiplen dermalen oder subkutanen derben Knoten und Plaques mit mehr oder weniger stark haarloser, erythematöser und ulzerierter Epidermis (SCOTT et al. 2001). Als weiterer maligner histiozytärer Tumor wurde kürzlich das lokalisierte histiozytäre Sarkom von AFFOLTER und MOORE (2002) beschrieben. Dieser Tumor findet sich nicht in der WHO-Klassifikation von 1998, er wird jedoch in einigen Fachbüchern neueren Datums unter den histiozytären Tumoren genannt (SCOTT et al. 2001; JACOBS et al. 2002). Es handelt sich um einen solitären, infiltrativ wachsenden Tumor, der bei Hunden im Alter von 6-11 Jahren auftritt. Der Tumor findet sich vor allem an den Gliedmaßen und ist oft in der Nähe eines Gelenkes lokalisiert. Durch das schnelle, infiltrative Wachstum sind in der Regel Haut, Unterhaut, Muskulatur, Faszien und Gelenkkapsel betroffen. Das histiozytäre Sarkom kann aber auch in anderen Lokalisationen, wie Milz, Lunge, Gehirn, Nasenhöhle und Knochenmark vorkommen. Im späteren Krankheitsverlauf kann eine Metastasierung statt finden (AFFOLTER und MOORE 2002). Das histiozytäre Sarkom und die maligne Histiozytose treten am häufigsten bei Berner Sennenhunden, Rottweilern und Retrievern auf. Histologisch finden sich in beiden Fällen große pleomorphe runde bis spindelförmige Tumorzellen mit runden, ovalen oder nierenförmigen Zellkernen. Es sind zahlreiche atypische Mitosen und mehrkernige Riesenzellen zu sehen und im Tumorgewebe liegen nekrotische Areale vor (AFFOLTER 1998; SCOTT et al. 2001). Bei manchen Tieren mit maligner Histiozytose findet eine massive Erythrophagie durch die Tumorzellen statt, die klinisch zu einer Anämie führen kann (JACOBS et al. 2002). Das Expressionsmuster verschiedener leukozytärer Antigene ist bei beiden Tumorformen identisch und weist darauf hin, dass beide Tumoren von myeloischen dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen ausgehen (AFFOLTER und MOORE 2002). Die Autoren gehen jedoch nicht darauf ein in wieweit sich diese Annahme mit dem Phänomen der Erythrophagie vereinbaren lässt. Da das histologische Bild des lokalisierten histiozytären Sarkoms und der malignen Histiozytose keine Unterschiede aufweist und die gleiche Rassedisposition für beide Erkrankungen besteht, wird vorgeschlagen beide Tumorformen als histiozytäre Sarkome zu bezeichnen und als Gegenüberstellung zum lokalisierten histiozytären Sarkom für

die maligne Histiozytose den Namen disseminierte histiozytäres Sarkom einzuführen. (AFFOLTER 1998; SCOTT et al. 2001; JACOBS et al. 2002)

2.2.3 Malignes fibröse Histiozytom

In ihrer Einteilung der Hauttumoren führen SCOTT et al. (2001) das maligne fibröse Histiozytom, das in der WHO-Klassifikation als Tumor des Bindegewebes bezeichnet wird, unter den histiozyären Tumoren auf. Es ist allgemein umstritten, ob das maligne fibröse Histiozytom überhaupt ein eigenständiges Krankheitsbild darstellt oder, ob die Bezeichnung malignes fibröses Histiozytom als Überbegriff für eine Vielzahl schlecht klassifizierbarer Sarkome unterschiedlicher Histogenese dient. Die Annahme, dass undifferenzierte mesenchymale Zellen die Ursprungszellen des Tumors sind könnte das pleomorphe Zellbild dieses Sarkom erklären. Andererseits kann das uneinheitliche Bild des Tumors auch dafür sprechen, dass pleomorphe Formen unterschiedlicher Sarkome mit ähnlichen histologischen Eigenschaften, wie Fibrosarkom, histiozytäres Sarkom, Liposarkom, Synoviazellsarkom und Leiyo- oder Rhabdomyosarkom, mit Hilfe dieses Überbegriff zusammengefaßt werden (SCOTT et al. 2001; AFFOLTER und MOORE 2002). Trotz des Namens „Histiozytom“ wird das maligne fibröse Histiozytom in der Regel den Tumoren des Bindegewebes zugeordnet. Die infiltrativ wachsenden Tumoren finden sich am häufigsten solitär in der Haut und Unterhaut sowie in der Milz, es können aber auch andere Organe betroffen sein und multiples Auftreten ist möglich (GOLDSCHMIDT und HENDRICK 2002). Histologisch findet sich eine Mischung von pleomorphen histiozytären Zellen und fibroplastischen Zellen, die oft sternförmig um einen zentralen Punkt angeordnet sind („storiform“). Mehrkernige Riesenzellen können vorhanden sein, sie sind jedoch bei der Katze wesentlich häufiger (GLEISER et al. 1979). In Anlehnung an die Humanmedizin unterscheidet man 3 Subtypen, den „storiform pleomorphic type“, den „giant cell type“ und den „inflammatory type“ (HENDRICK et al 1998). MORRIS et al. (2002) vermuteten, dass undifferenzierte Sarkomen, die häufig beim Flat Coated Retriever beobachtet werden, maligne fibröse Histiozytome sind. AFFOLTER und MOORE (2002) gehen jedoch davon aus, dass es sich bei einem Großteil der Tumoren, die als maligne fibröse Histiozytome angesehen wurden, um histiozytäre

Sarkome handelte. In einer Studie von KERLIN und HENDRICK (1996) fanden sich bei einer Vielzahl von Patienten Sarkome, die in einigen Arealen die Eigenschaften des malignen fibrösen Histiozytoms besaßen und in anderen Arealen die Charakteristika der malignen Histiozytose aufwiesen.

2.2.4 Benignes fibröses Histiozytom

Das benigne fibröse Histiozytom beim Hund wird nur selten in der Literatur aufgeführt. Es scheint zudem eher den Charakter einer Spindelzellproliferation aufzuweisen (PEREZ et al. 1996 a). Laut SCOTT et al. (2001) handelt es sich um einen seltenen gutartigen Tumor oder eine reaktive Proliferation unklarer Ätiologie. Es tritt solitär oder multipel bei Hunden im Alter von 2-4 Jahren auf. Retriever und Collies sind häufig betroffen und die Läsionen können in der Haut und in der Kornea auftreten. Histologisch liegen unscharf begrenzte Infiltrate vor, die vor allem aus Fibroblasten und histiozytären Zellen bestehen. Teilweise findet sich eine Fingerabdruck-artige Anordnung der Zellen. An anderer Stelle wird der Ausdruck fibröses Histiozytom lediglich als Synonym für eine noduläre granulomatöse Episkleritis genannt und nicht in Verbindung mit Hautläsionen gebracht (YAGER et al. 1992; WILKOCK 1992).

2.2.5 Xanthom

Das Xanthom wird in der aktueller WHO Klassifikation als Tumor-artige Läsion unter den benignen histiozytären Tumoren aufgeführt (HENDRICK et al. 1998). Es tritt nur äußerst selten beim Hund auf und ist eine multifokale Akkumulation von schaumigen Makrophagen in der Haut. Bei anderen Haustieren kommt diese Läsion häufiger vor und ist zum Teil mit erhöhten Cholesterin- oder Lipidspiegeln im Plasma assoziiert (GOLDSCHMIDT und HENDRICK 2002).

2.3 Immunantwort gegen Tumoren

2.3.1 Effektorzellen der Immunantwort

Zu den Effektorzellen der Immunantwort gegen Tumoren gehören zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. Neben diesen zytotoxisch wirkenden Zellen erfüllen die CD4⁺ T-Zellen und die Antigen-präsentierenden Zellen eine Schlüsselfunktion, in dem sie die Aktivierung der zellulären Reaktion vermitteln. Die humorale Immunantwort ist wahrscheinlich nur im Rahmen der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC, „antibody dependant cellular cytotoxicity“) von Bedeutung. Für die Aktivierung, Funktion und Interaktion der genannten Immunzellen sind außerdem zahlreiche Zytokine notwendig (ABBAS et al. 2000; TIZZARD 2000). Noch immer ist nicht klar, welcher Zellpopulation die größte Bedeutung bei der Abwehr von Tumoren zukommt und welche Effektormechanismen sich für die Entwicklung von therapeutischen Strategien eignen (DRAKE und PARDOLL 2002). Das Vorliegen von Tumor-infiltrierenden Leukozyten ist bei zahlreichen Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert und man ging bislang davon aus, daß durch die entzündliche Reaktion das Tumorwachstum eingedämmt wird. Allerdings finden sich auch Hinweise dafür, dass infiltrierende Entzündungszellen und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6 sowie verschiedene Chemokine zum Tumorwachstum und zur Tumorprogression beitragen könnten, indem sie DNA-Schäden, eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur, verstärkte Angiogenese und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren bewirken (BALKWILL und MANTOVANI 2001; DRAKE und PARDOLL 2002).

2.3.1.1 CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten

Zu den wichtigsten Effektorzellen der Tumormunität gehören die CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Sie erkennen tumorspezifische Antigene, wenn diese in Zusammenhang mit MHC I präsentiert werden durch Bindung des T-Zell-Rezeptors (TITU et al. 2002). Die Lyse der Zielzelle durch CTLs geschieht nach spezifischer Bindung des Antigenrezeptors mit Hilfe der Enzyme Perforin und

Granzym. Perforin wird aus zytoplasmatischen Granula freigesetzt und lässt Poren in der Membran der Zielzellen entstehen. Durch diese Öffnungen kann das Enzym Granzym eintreten und Kaspasen in der Zielzelle aktivieren. So geht die Zelle schließlich durch osmotische Lyse und durch induzierte Apoptose unter. (ABBAS et al. 2000). Neben der Zerstörung von Tumorzellen durch Freisetzung dieser löslichen zytolytischen Faktoren sind CTLs in der Lage durch verschiedene direkte Rezeptor/Liganden-Interaktionen die Apoptose der Zielzelle auszulösen. Dabei ist neben dem $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Zelluntergang das Fas/Fas-Ligand-System der bekannteste zytotoxische Mechanismus (KÄGI et al. 1994). Alterationen in diesem System wurden in einer Vielzahl von humanen Hauttumoren nachgewiesen (PANFILIS 2001). In letzter Zeit wird TRAIL („Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand“), einem weiteren Mitglied der $\text{TNF}\alpha$ -Superfamilie, zunehmende Bedeutung beigemessen und Tumorzellen scheinen insbesondere gegenüber TRAIL vermittelter Zytotoxizität sensibel zu sein (HOSKIN 2000; SMYTH et al. 2003). Die von CTLs getragene Immunantwort erfordert zuvor die Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen. Dazu ist, insbesondere wenn die Zielzellen kein MHC I exprimieren, die Unterstützung von Antigen-präsentierenden Zellen und CD4^+ T-Zellen notwendig (BENNETT et al. 1997).

2.3.1.2 CD4^+ T-Helferzellen

CD4^+ T-Zellen erkennen exogene Antigene, die im Zusammenhang mit MHC II präsentiert werden. Sie werden an Hand der gebildeten Zytokine klassischerweise in Th(Typ)1 - und Th(Typ)2 -Zellen unterteilt. Weitere Untergruppen von T-Zellen, wie Th3 -Zellen, Tr1 -Zellen und Th0 -Zellen wurden beschrieben. Das Zytokinprofil dieser Subpopulationen ist ausschlaggebend für den weiteren Verlauf der Immunantwort. (MOSMANN und SAD 1996; CARTER und DUTTON 1996). Die Hauptaufgabe Tumor-spezifischer CD4^+ T-Zellen besteht wahrscheinlich in der Bereitstellung von Th1 -Zytokinen, um die Differenzierung und Proliferation zytotoxischer CD8^+ T-Zellen und somit eine effektive T-Zell Antwort zu ermöglichen. Die Freisetzung von Zytokinen resultiert außerdem in der Akkumulation und Aktivierung weiterer Effektorzellen wie tumoriziden Makrophagen und Lymphokin-aktivierten-Killerzellen

(LAK), die ebenfalls maßgeblich zum Untergang der Tumorzellen beitragen können (HUNG et al. 1998; FOSS 2002; COHEN et al. 2000). Für die Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen ist kein direkter Kontakt der CD4⁺ T-Zellen mit den Tumorzellen und keine MHC II-Expression auf der Tumorzelle selbst notwendig, da die Antigen Erkennung über professionelle Antigen-präsentierende Zellen erfolgen kann (COHEN et al. 2000). Hierbei spielt die Interaktion co-stimulatorischer Moleküle eine wichtige Rolle um eine ausreichende T-Zell-Antwort zu ermöglichen (OSSENDORP et al. 2000).

2.3.1.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind im Gegensatz zu den CTLs, in der Lage ihre Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung zu zerstören. Sie werden durch die Bindung des MHC I-Moleküles in ihrer zytolytischen Funktion inhibiert und richten sich dem zufolge gegen infizierte Zellen oder Tumorzellen, die wenig oder kein MHC I exprimieren und von CTLs nicht erkannt werden. (HEBERMANN 2002; TIZZARD 2000) Außer inhibitorischen Rezeptorinteraktionen, die die Lyse von normalen MHC I- positiven Zellen verhindern, wurden auf NK-Zellen sogenannte „natural cytotoxicity receptoren“ (NCR) identifiziert, die bei Bindung an ihre Liganden eine Aktivierung der NK-Zellen hervorrufen und zur Erkennung von Tumorzellen beitragen (LONG 2002; MORETTA et al. 2002, MORETTA 2002). Als ausführende Zelle der ADCC erkennen NK-Zellen außerdem IgG markierte Zellen durch Bindung an Fc-Rezeptoren (ABBAS et al. 2000). NK-Zellen üben ihre zytotoxische Funktion wie CTLs mit Hilfe von Perforin und Granzym aus und können ebenfalls durch Liganden der TNF α -Superfamilie die Apoptose von Zielzellen induzieren (VUJANOVIC 2001). Neben ihrer Funktion als zytotoxische Effektorzellen besteht eine wichtige Funktion der NK-Zellen in der Bildung von Zytokinen, insbesondere von IFN γ (MILLER 2002), welches die Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und CTLs unterstützt. Die zytotoxische Funktion der NK-Zellen wird durch IL-2 und IL-12 verstärkt, ein Vorgang den man sich zu nutzen macht, in dem man sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAKs) therapeutisch einsetzt. (FOSS 2002, ABBAS et al. 2000).

2.3.1.4 Makrophagen

Bei vielen Tumorformen stellen Makrophagen einen Teil der leukozytären Infiltration im Tumorgewebe dar. Inwieweit sich das Vorhandensein von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) jedoch positiv oder negativ auf das Tumorwachstum auswirkt ist nicht geklärt, da außer der tumoriziden Wirkung von Makrophagen auch zunehmend proliferationsfördernde Effekte, die von Makrophagen ausgehen, beobachtet werden. (BALKWILL und MANTOVANI 2001). Um ihre antitumorale Funktion ausüben zu können, müssen Makrophagen zuvor aktiviert werden. Dies kann zum Beispiel durch Interferon, Lipopolysaccharide oder Bindung an Fc-Rezeptoren bei der ADCC geschehen (BINGLE et al. 2002). Ihre zytotoxische Wirkung wird durch Freisetzung von Proteasen, reaktiven Sauerstoffverbindungen und Stickstoffmonoxid (NO) erreicht. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) generiert aus Arginin Citrullin, wodurch NO frei wird, das mit reaktiven Sauerstoffverbindungen hoch reaktive Radikale bildet und zytotoxisch wirkt. (ABBAS et al. 2000). NO scheint maßgeblich an der tumoriziden Aktivität von Makrophagen beteiligt zu sein (HUNG et al. 1998). Andererseits konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte iNOS-Expression der Tumor-assoziierten Makrophagen die Neovaskularisation fördert und den Blutfluß erhöht (BINGLE 2000). Möglicherweise ist die Wirkung von NO auf Tumoren Dosis-abhängig und begünstigt in niedrigen Konzentrationen die Angiogenese und somit das Tumorwachstum, bei hohen Konzentrationen hingegen übt es eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aus. (JENKINS et al. 1995). Makrophagen sind, anders als NK-Zellen und T-Zellen, in der Lage Phagozytose zu betreiben. Sie können durch starke MHC II-Expression CD4+ T-Zellen aktivieren und sie setzen Zytokine frei, die zur Rekrutierung weitere Entzündungszellen beitragen bzw. direkt zytotoxisch wirken (FOSS 2002).

2.3.1.5 Dendritische Antigen-präsentierenden Zellen

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) geraten zunehmend ins Interesse der Immuntherapie zur Induktion einer Tumor-spezifischen Immunität (BANCHEREAU und STEINMAN 1998). Antigen-beladene dendritische Zellen

erfüllen eine entscheidende Aufgabe bei der Aktivierung Tumor-spezifischer T-Zellen (ZHOU et al. 2002). Sie sind in der Lage Tumorzellen oder Teile davon aufzunehmen und ihre Antigene MHC II-gebunden den CD4+ T-Zellen zu präsentieren. Genauso können APCs exogene Tumorantigene aufnehmen und in Verbindung mit MHC I präsentieren, wodurch eine indirekte Aktivierung der CD8+ T-Zellen ermöglicht wird. Entscheidend ist dabei, dass Antigen-präsentierende Zellen co-stimulatorische Moleküle zur Verfügung stellen, die für eine effektive Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind (FOSS 2002). Dieses Phänomen, genannt „cross presentation“, ist im Falle von Tumorzellen, denen MHC oder andere co-stimulatorische Moleküle fehlen von besonderer Bedeutung (HUANG et al. 1994; REID 2001; CARBONE et al. 1998). Man geht inzwischen davon aus, dass für eine optimale Aktivierung das Antigen gleichzeitig von einer zytotoxischen T-Zelle und einer T-Helferzelle auf derselben Antigen-präsentierenden Zelle erkannt werden muß. Dabei ist vermutlich die Bereitstellung von CD40 durch T-Helferzellen ausschlaggebend. (BENNETT et al. 1998). Durch die Interaktion von dendritischen Zellen und NK-Zellen wird außerdem die Reifung und Potenzierung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen bewirkt (MORETTA 2002).

2.3.1.6 Zytokine

Zytokine sind Peptide oder Glykopeptide, die löslich oder membrangebunden vorliegen können und als Mediatoren bei der Interaktion von Zellen im Rahmen der Immunantwort dienen. Einzelne Zytokine besitzen meist eine Vielzahl von Funktionen und können auf unterschiedliche Zellpopulationen wirken. Zudem gibt es viele Zytokine deren Funktionen sich teilweise überschneiden. Wichtige pro-inflammatorische Zytokine, die bei der Immunantwort gegen Tumoren eine Rolle spielen sind Interleukin (IL)-2 und Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$), die in erster Linie von lymphatischen Zellen gebildet werden sowie die Zytokine IL-12 und Tumor-Nekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$), die vor allem Produkte der Makrophagen sind. Sie üben einen positiven Effekt auf die Differenzierung, Proliferation oder Aktivierung der zellulären Effektoren aus. Die hauptsächlich von Makrophagen gebildeten Zytokine IL-1 und IL-6 besitzen ein weites Wirkungsspektrum, unter anderem haben sie einen

pro-inflammatorischen Einfluß auf die zelluläre Immunantwort. IL-8 besitzt als Chemokin eine chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen. IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF β) sind Vertreter der sogenannten anti-inflammatorischen Zytokine, die den Effekten der oben genannten Zytokine entgegensteuern und deren physiologische Rolle in der Limitierung einer entzündlichen Reaktion besteht. Sie werden von einigen Tumorzellen gebildet, um die Aktivierung und Proliferation zytotoxischer Zellen zu unterbinden. (ABBAS et al. 2000; TIZZARD 2000; ROITT et al. 2000)

IL-1 ist ein multifunktionales, stark inflammatorisches Zytokin, dass von Monozyten und Makrophagen aber auch von vielen anderen Zelltypen gebildet werden kann und eine wichtige Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen hat. Es induziert die Synthese von IL-2 und IL-2 Rezeptoren in Lymphozyten und unterstützt die Generation von CTLs. Ein zytostatischer bzw. zytotoxischer Effect von IL-1 auf verschiedene Tumorzelllinien konnte nachgewiesen werden (DINARELLO 1998) (LE UND VILCEK 1987)

IL-2 ist für die klonale Expansion von T-Lymphozyten nach Antigenkontakt verantwortlich. Es wird vor allem von CD4⁺ T-Lymphozyten, aber auch von NK-Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten gebildet und hat eine ausgeprägte autokrine Wirkung. Es unterstützt in erster Linie die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen, stimuliert aber auch das Wachstum von NK-Zellen und B-Zellen (ABBAS et al. 2000). IL-2 unterstützt die Funktionen von NK-Zellen in dem es die FAS-Ligand und Granzym vermittelte Zytotoxizität unterstützt und dadurch die sogenannten Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) entstehen (RODELLA et al. 1997). Die Fähigkeit von IL-2 die Zelllyse durch NK-Zellen und CTLs zu stimulieren, hat es als biologisches Agens in das Interesse der Immuntherapie gerückt (FEHNINGER et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 das Wachstum von Tumoren hemmt und es wird zum Teil erfolgreich zur Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt (ROSENBERG 2001 a + b).

IL-6 ist ein Zytokin mit ausgeprägter Pleiotrophie, das von vielen Zelltypen, nach Stimulation durch IL-1 oder TNF α gebildet werden kann. Zu seinen Funktionen

gehört die Induktion der Differenzierung, Proliferation und IL-2 Expression von T-Zellen. Experimentell hemmt IL-6 das Wachstum einiger Tumorzelllinien. (LE und VILCEK 1989; HIRANO et al. 1990) In einer Studie von MC INTOSH et al. (1989) konnten im Serum von Tumor-tragenden Mäusen erhöhte IL-6 Spiegel nachgewiesen werden.

Als Zytokin mit chemotaktischer Wirkung gehört **IL-8** (CXCL8) zu den sogenannten Chemokinen. Es stimuliert in erster Linie die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, übt aber auch einen Effekt auf andere Leukozyten aus. Ob IL-8 eine chemotaktische Wirkung auf T-Zellen ausübt ist umstritten (WUYTS et al. 1998). IL-8 besitzt einen positiven Einfluß auf die Angiogenese und unterstützt so möglicherweise das Wachstum von Tumoren (KOCH et al. 1992). Außerdem kann es die Expression von bestimmten Metalloproteinasen verstärken und dadurch das invasive Verhalten von Tumoren beeinflussen (STRIETER 2001).

IL-10 ist eines der Zytokine mit anti-inflammatorischer Wirkung und ein wichtiger Regulator der zellulären Immunantwort. Es wird von T-Zellen, Monozyten und B-Zellen gebildet und inhibiert die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsynthese von Lymphozyten (MOORE et al. 2001). Es hemmt die Aktivierung von Makrophagen und die Produktion von IL-12 und $\text{TNF}\alpha$ sowie die Expression von MHC II und co-stimulatorischen Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Vermutlich ist die Fähigkeit von IL-10, die Zytokin-Synthese in T-Zellen und NK-Zellen zu hemmen, auf diese Beeinträchtigung der Antigen-präsentierenden Zellen zurück zu führen (FIORENTINO et al. 1991). In verschiedenen malignen Zelltypen konnte IL-10 Synthese nachgewiesen werden und vermutlich stellt die Produktion dieses Zytokins eine Möglichkeit dar, der Immunantwort gegen Tumoren zu entweichen (KIM et al. 1995).

IL-12 wird von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet und nutzt die Mechanismen der erworbenen und der angeborenen Immunität um seine Wirkung gegen Tumoren auszuüben (BINGLE et al. 2002). Es fördert die Proliferation und zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten und induziert die Zytokinsekretion, insbesondere von $\text{IFN}\gamma$ und IL-2 in

diesen Zellen. Ein weiterer Effekt dieses Zytokins ist die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen (BRUNDA 1994; TRINCHIERI 2003). Über IFN γ führt es indirekt zur Aktivierung von Makrophagen (BRUNDA et al. 1996). In verschiedenen Studien wurde ein starker antitumoraler und antimetastatischer Effekt von IL-12 nachgewiesen, der durch die Proliferation und Aktivierung von NK- und T-Zellen und die daraus resultierende Zytokinsekretion, vor allem von IFN γ , vermittelt wird. (FUJIWARA 1996; YU et al. 1997; COLOMBO und TRINCHIERI 2002). Obwohl IL-12 im Tierversuchen einen deutlichen therapeutischen Effekt gegen verschiedene murine Tumoren zeigt, konnte es jedoch bislang wegen seiner starken Toxizität klinisch nicht eingesetzt werden (SMYTH et al. 2000).

Das von Makrophagen und anderen Immunzellen gebildete Zytokin **TNF α** ist ein wichtiges Effektormolekül für die T-Zell und NK-Zell vermittelte Lyse von immunogenen Tumorzellen. Es fördert die Proliferation und IFN γ -Produktion in T-Lymphozyten und NK-Zellen (LE und VILCEK 1987). Neben seiner Bedeutung für die Aktivierung zytotoxischer Zellen besitzt es eine direkte antitumorale Wirkung indem es durch Rezeptorbindung die Apoptose von Tumorzellen auslösen kann oder in hohen lokalen Konzentrationen durch Induktion von Gefäßthrombosen die Nekrose des Tumorgewebes hervorruft (ABBAS et al. 2000). Andererseits scheint chronisch niedrig dosiertes TNF α auch als Tumorpromotor zu wirken, da es die DNA-Mutagenese durch reaktive Stickstoffverbindungen und die Ausbildung eines Tumorstromas begünstigt (BALKWILL 2002).

IFN γ wird von NK-Zellen und aktivierten T-Zellen nach IL-12 Stimulation oder Antigenkontakt gebildet. Es ist ein wichtiges Zytokin für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen und es scheint nicht nur die zytolytische Aktivität von Effektorzellen zu unterstützen, sondern auch deren Migration ins Tumorgewebe zu beeinflussen (NAKAJIMA et al. 2001). Es stimuliert die Expression von MHC I und II auf APCs, es fördert die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen und unterstützt die Bildung bestimmter opsonierender Antikörper (ABBAS et al. 2000). IFN γ verstärkt die iNOS-Genexpression in Makrophagen und bewirkt so die Produktion großer Mengen NO, einer Substanz die

eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von Tumorzelllinien gezeigt hat (FUJIWARA et al. 1997). Es gibt Hinweise dafür, daß IFN γ zudem eine protektive Wirkung gegen Tumoren ausübt, indem es eine Inhibition der zellulären Proliferation und der Angiogenese hervorruft. Die Bedeutung von IFN γ im Rahmen der Tumorummunität wurde dadurch bekannt, dass die Abstoßung von transplantierten chemisch induzierten Fibrosarkomen in Mäusen durch neutralisierende Antikörper gegen IFN γ aufgehalten wurde (IKEDA et al. 2002). Außerdem zeigten IFN γ -defiziente Mäuse in Tierversuchen häufiger Tumoren und es ist anzunehmen, dass dieses Zytokin eine Rolle beim Schutz vor spontan entstehenden Tumoren spielt (SMYTH et al. 2001).

Das antiinflammatorische Zytokin **TGF β** unterdrückt das Wachstum von T- und B-Zellen. Es übt einen negativen Einfluß auf die TNF α Synthese, die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und die Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen aus. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass TGF β die Entstehung spezifischer zytotoxischer T-Zellen inhibiert und eine Verringerung der zellulären Infiltration mit herabgesetzter MHC II Expression und erniedrigter Anzahl von CD8+ T-Zellen im Gewebe Virus-infizierter Tiere hervorruft. In Hinsicht auf seine Bedeutung im Rahmen der Tumorummunität konnte für Glioblastome und die akute T-Zell-Leukämie nachgewiesen werden, dass die Tumorzellen durch die Bildung von TGF β zu einer Immunsuppression führen. (FONTANA et al. 1992)

2.3.2 Grenzen der Tumorummunität

Tierversuche und klinische Studien haben gezeigt, dass Tumoren unter Umständen eine Immunreaktion des Wirtes hervorrufen, die zur Unterdrückung des Tumorwachstums führen kann. Dieser Vorgang beruht vermutlich darauf, dass sich die neoplastischen Zellen durch Verlust, Zugewinn oder Veränderung von Antigenen auf der Zelloberfläche von normalen Zellen unterscheiden und als fremd erkannt werden. Dabei stimmen die onkogenen Mutationen und die Mutationen, die zur Veränderung der Antigene führen meist nicht überein. Die immunogen veränderten oder überexprimierten Peptidantigene werden als Tumor-spezifische Antigene

(TSAs) oder Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) bezeichnet (ROITT et al. 2001). Auf diesen Beobachtungen basierend ging man in den 60er Jahren von dem Konzept der „Immune Surveillance“ (BURNET 1967) aus, nach dem das Immunsystem, die aus ständigen Mutationen hervorgehenden, neoplastischen Zellen als fremd erkennt und meistens eliminiert bevor es zur Manifestation von Tumoren kommt. Lediglich Ausnahmefälle, in denen neoplastische Zellen Mechanismen entwickelt haben, um sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen, führen nach dieser Hypothese zu progressive Tumoren (PARDOLL 2001). Inzwischen weiß man jedoch, dass die Mehrzahl der spontan entstehenden Tumoren nur schwach immunogen ist und keine oder eine kaum nachweisbare Immunreaktion auslöst. Das äußert sich auch darin, dass Nacktmäuse oder andere immunsupprimierte Lebewesen keine erhöhte Inzidenz für nicht-Virus-assoziierte Tumorerkrankungen zeigen (DRAKE und PARDOLL 2002; ROITT et al. 2001). Gründe für diese fehlende oder unzureichende Immunantwort können schwach immunogene bzw. maskierte Antigene, eine unzureichende Antigenpräsentierung, oder eine Hemmung der Aktivierung von Effektorzellen sein (FOSS 2002). Weitere Strategien mit deren Hilfe sich Tumoren der Immunantwort entziehen sind die Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF β oder, im Falle von Fas-resistenten Tumoren, die Induktion einer Fas-Ligand vermittelten Apoptose von tumorspezifischen Lymphozyten (O'CONNEL 2000). Die herkömmliche Hypothese der „Immune Surveillance“ ist heute nur noch eingeschränkt gültig und man geht davon aus, dass die Expression von Tumorspezifischen Antigenen mit dem Vorhandensein von bestimmten stimulatorischen Signalen „danger signals“ (MATZINGER 1994) zusammenfallen muß, um eine ausreichende Immunantwort zu induzieren. Wenn Tumorantigene in einem Umfeld ohne stimulatorische Signale exprimiert werden, sind die Antigen-präsentierenden Zellen nur unzureichend aktiviert und es entwickelt sich, statt einer Tumorspezifischen Zytotoxizität, eher eine Immuntoleranz gegenüber diesem Antigen. Demzufolge ist nicht nur die spezifische Antigen/T-Zell-Interaktion für die Entstehung der spezifischen Immunität ausschlaggebend, sondern auch die lokalen Umgebungsverhältnisse, unter denen diese Interaktion statt findet. (SEITER und MARINCOLA 2000; SMYTH et al. 2001; PARDOLL 2001; SOGN 1998)

2.4 Spontanregression natürlich auftretender Tumoren der Haussäugetiere

In experimentellen Studien wurden verschiedene Wege, mit deren Hilfe das Immunsystem Tumorzellen eliminiert, dargestellt. Auch klinisch konnten im Blut oder Gewebe von Patienten Tumor-spezifische Antikörper bzw. T-Zellen, als Ausdruck einer spezifischen Immunantwort, nachgewiesen werden (ABBAS et al. 2000). Trotzdem stellt die Regression natürlich auftretender Neoplasien eine Ausnahme dar. In der Humanmedizin sind Tumoren, die sich spontan zurückbilden, wie z.B. das Melanom (WAGNER et al. 1998), Gegenstand intensiver Forschung. Das folgende Kapitel beschränkt sich jedoch auf Beispiele natürlicher Tumorregression aus dem Bereich der Haussäugetiere, wie den übertragbaren venerischen Tumor, das Melanom des Sinclair Miniaturschweins und das Papillom. Auf die Regression des kutanen Histiozytoms wurde bereits in 2.1.4 eingegangen.

2.4.1 Übertragbarer Venerischer Tumor

Der übertragbare venerische Tumor ist ein Rundzelltumor, der vor allem an der Genitalschleimhaut von Kaniden auftritt und als Transplantationsmetastase häufig beim Deckakt übertragen wird. Die Tumorzellen weisen eine ähnliche Morphologie, wie die des kaninen kutanen Histiozytoms auf, zeigen jedoch auffällige Chromosomenaberrationen. Gelegentlich kommt es zur Metastasierung in regionäre Lymphknoten oder zur Ausbildung von Tumoren in extragenitalen Lokalisationen (GOLDSCHMIT und HENDRICK 2002). In den meisten Fällen tritt jedoch nach einer progressiven Phase die spontane Rückbildung des Tumors ein, die mit einem Anstieg der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im Tumorgewebe (GONZALES et al. 2000) und einer erniedrigten Tumorzellproliferation (CHU et al. 2001) assoziiert ist. PEREZ et al. (1998) konnten zusätzlich zu einem Anstieg von CD3+ T-Lymphozyten auch eine erhöhte Anzahl von B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in regressiven Tumoren nachweisen. Gegenüber der progressiven Phase, kommt es in der regressiven Phase des Tumors zu einer gesteigerten MHC I- und MHC II-Expression auf den Tumorzellen. Daraus kann man schliessen, dass sich der

übertragbare venerische Tumor zunächst durch herabgesetzte Expression von MHC-Molekülen der T-Zell Antwort entzieht und später erst, durch Zytokinfreisetzung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, eine normale MHC-Expression einsetzt, die die Regression des Tumors zur Folge hat (HSIAO et al. 2002).

2.4.2 Melanom des Sinclair-Miniaturschweines

Sinclair-Miniaturschweine haben eine besondere Rassendisposition für das Auftreten multipler kutaner Melanome, die im Ferkelalter tödlich verlaufen können (10-15%), jedoch in den meisten Fällen eine spontane Regression aufweisen und sich im Alter von 1-2 Jahren zurückbilden (MORGAN et al. 1996). Die Tumoren zeigen in der Morphologie und bezüglich des Verteilungsmusters von Organmetastasen eine große Ähnlichkeit mit malignen Melanomen des Menschen, und werden deshalb häufig als Tiermodell herangezogen. Bei der Regression kommt es zur Infiltration mit mononukleären Zellen, zur Depigmentierung und zur Fibrose des Tumors, vergleichbar mit der Regression von humanen Melanomen (OXENHANDLER et al. 1979 und 1982). Es konnte ein biphasischer Verlauf der Regression festgestellt werden. In der ersten Phase ist eine massive Infiltration mit Makrophagen zu verzeichnen und in der zweiten Phase tritt eine überwiegend lymphozytäre Infiltration des Tumorgewebes ein (GREENE et al. 1994). Eine Untersuchung von PATHAK et al. (2000) ergab, dass die Regression des Sinclair-Schwein-Melanoms mit einem Verlust der Telomerase-Aktivität und einer Reduktion von Telomer-Wiederholungen assoziiert ist. Dies führt zur Bildung von abnormalen Chromosomenkonfigurationen und resultiert schließlich im Zelltod.

2.4.3 Papillom

Papillome und Fibropapillome werden durch eine Infektion mit Papilloma-Viren, unbehüllten doppelsträngige DNA-Viren, verursacht und treten bei vielen Spezies in der Haut und der kutanen Schleimhaut auf. Die Papillome, umgangssprachlich als „Warzen“ bezeichnet, bilden sich in der Regel spontan zurück. Allerdings kann es zu langwierigen und extensiven Krankheitsverläufen mit persistenten Papillomen

kommen. (GOLDSCHMIT und HENDRICK 2002) Unter Umständen tritt bei oralen Papillomen des Hundes eine Progression zu Karzinomen ein (WATRACH et al. 1970). Untersuchungen verschiedener Autoren ergaben, dass die humorale Immunität zwar vor einer Reinfektion mit Papilloma-Viren schützt, jedoch keinen wesentlichen Einfluß auf die Regression bereits bestehender Papillome hat. Die Rückbildung von Papilloma-induzierten Läsionen wird von der zellulären Immunität getragen und Papillome in Regression weisen eine lymphozytäre Infiltration auf (NICHOLLS und STANLEY 2000). Die immunhistologische Untersuchungen regressiver kaniner oraler Papillome ergab, dass eine Infiltration mit CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten vorliegt, wobei die CD4+ T-Zellen zahlreicher vorhanden waren (NICHOLLS et al. 2001).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchte Hunde

Zur Untersuchung lagen Histiocytoome von 30 Hunden unterschiedlicher Rassen mit einem Durchschnittsalter von 2,6 Jahren (5 Monate bis 13 Jahre) vor (Tab.1). Die unfixierten Tumoren wurden kurz nach der operativen Entfernung bei Tierärzten abgeholt und innerhalb weniger Stunden für die nachstehenden Untersuchungen verarbeitet. Die Angaben zum Signalement des Tieres und zur Lokalisation des Tumors wurden von den behandelnden Tierärzten im Vorbericht mitgeteilt. Eine EDTA-Blutprobe jedes Patienten wurde mit Hilfe von automatisierten Hämatologiesystemen (H*1 und Advia 120, Bayer) gemessen, um die Erythrozyten- und Leukozytenzahl mit Differenzialblutbild zu ermitteln. Als Kontrollgewebe dienten Hautbiopsien aus dem Inguinalbereich von 4 gesunden Beaglen, die in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik, Giessen als Blutspendehunde eingesetzt wurden (Tab. 2). Drei der Kontrolltiere waren männlich und eines weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 7 Jahre (5 -10 Jahre).

Tab. 1: Tagebuch-Nummer., Rasse, Geschlecht und Alter der Hunde, Lokalisation des Histiocytooms und Datum der Operation

	Tgb.-Nr.	Rasse	Geschl., Alter	Lokalisation	OP
1	T9335/98	Mischling	m., 6 M	Knie	02.12.98
2	T990/99	Retriever Mischling	m., 5 M	Unterkiefer	08.02.99
3	T1442/99	Terrier Mischling	m., 1 J	Brustwand	24.02.99
4	T1642/99	Boxer	w., 4 J	Ohr	03.03.99
5	T1895/99	Staffordshire Terrier	m., 8 M	Zehe	11.03.99
6	T2058/99	Boxer Mischling	m., 6 M	Tarsus	18.03.99
7	T3222/99	Yorkshire Terrier	w., 13 J	Oberschenkel	03.05.99
8	T3739/99	Boxer	w., 3 J	Vorderpfote	20.05.99
9	T3901/99	Schäferhund	w., 13 M	Ohr	26.05.99

Fortsetzung Tab. 1:

	Tgb.-Nr.	Rasse	Geschl., Alter	Lokalisation	OP
10	T4257/99	Dogge	m., 1 J	Ohr	09.06.99
11	T4296/99	Bedlington Terrier	m., 2 J	Lefze	10.06.99
12	T4429/99	Rottweiler	w., 6 M	Wange	15.06.99
13	T5935/99	Labrador Mischling	w., 9 M	Thorax	09.08.99
14	T6195/99	Boxer	w., 3 J	Ohr	16.08.99
15	T6196/99	Yorkshire Terrier	w., 2 J	Nasenspiegel	16.08.99
16	T6641/99	Dogge	m., 3 J	Tarsus	01.09.99
17	T6646/99	Fox Terrier	m., 3 J	Metacarpus	01.09.99
18	T7435/99	Rauhaardackel	w., 1 J	Augenlid	30.09.99
19	T8031/99	Deutsch Kurzhaar	m., 1,5 J	Vorderbein	22.10.99
20	T8520/99	Labrador Mischling	m., 3 J	Nacken	10.11.99
21	T106/00	Jack Russel Terrier	m., jung	Vorderbein	06.01.00
22	T391/00	Pit Bull	w., 1 J	Thoraxwand	17.01.00
23	T594/00	Rottweiler	w., 6 M	Lefze	24.01.00
24	T811/00	Husky Mischling	w., 1,5 J	Metatarsus	29.01.00
25	T1190/00	Mischling	w., 2,5 J	Augenlid	14.02.00
26	T1481/00	Pit Bull	w., 4 J	Vorderpfote	24.02.00
27	T1881/00	Staffordshire Terrier	m., 1 J	Nasenrücken	10.03.00
28	T2191/00	Labrador Mischling	w., 4 J	Ohr	23.03.00
29	T2639/00	Dogge	m., 4 J	Ohr	07.04.00
30	T3838/00	Cocker Mischling	m., 1 J	Ohr	29.05.00

Tgb.-Nr. = Tagebuchnummer, w = weiblich, m = männlich, J = Jahre, M = Monate, OP= Datum der Operation

Tab. 2: Kontrollhunde: Nummer, Name, Rasse, Geschlecht und Alter der Hunde, Lokalisation der Hautbiopsie und Datum der Entnahme.

	Nr., Name	Rasse	Geschl., Alter	Lokalisation	Datum
1	B4 Dusty	Beagle	m., 5 J	Inguinalbereich	14.06.99
2	B5 Eddy	Beagle	m., 5 J	Inguinalbereich	14.06.99
3	B6 Marie	Beagle	w., 8 J	Inguinalbereich	02.08.99
4	B9 Marco	Beagle	m., 10 J	Inguinalbereich	01.08.99

w = weiblich, m = männlich, J = Jahre

3.2 Gewebeproben für die Histologie, Immunhistologie und RT-PCR

3.2.1 Herstellung der Gefrierblöcke und Paraffinblöcke

Für die Herstellung der Gefrierblöcke wurden die Gewebeproben halbiert, eine Hälfte mit der Schnittfläche nach unten auf den Boden eines Aluminiumhütchens gelegt und mit Tissue Tec[®] OCT überschichtet. Die Aluminiumhütchen wurden in ein Isopentan[®]-Bad gestellt und durch umgebenden flüssigen Stickstoff gekühlt. Anschließend wurden die Gefrierblöcke bis zur Weiterbearbeitung bei -70°C gelagert (WÜNSCHMANN et al. 1999). Der verbleibende Teil der Probe wurde für mindestens 24 Stunden in 10%igem nicht-gepuffertem Formalin fixiert. Nach maschineller Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung der Proben bei 58°C in einem Paraffin-Paraplast[®]-Gemisch. Die Größe der Histiocytozome wurde als Durchmesser der Schnitteben im Paraffinblock gemessen.

3.2.2 Herstellung der Gefrierschnitte und Paraffinschnitte

Für den Immunhistologischen Nachweis der Antigene CD3 ϵ , CD21(like), CD4 und CD8 wurden 10 μ m dicke Serienschnitte jedes Gefrierblockes mit einem Kryotom der Firma Reichert-Jung (Frigocut, Modell 2700) geschnitten und je zwei Schnitte auf einen Super Frost/Plus[®]-Objekträger (Menzel Gläser) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte 10 min luftgetrocknet und weitere 10 min in Aceton fixiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Schnitte bei -70° C gelagert.

Für den immunhistologischen Nachweis des myeloischen/histiozytären Antigens und Lysozyms sowie für den TUNEL-Essay wurden 3-4 μ m dicke Paraffinschnitte in Serie geschnitten, auf Super Frost/Plus-Objekträger (Menzel Gläser) aufgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Für die Diagnosestellung und Gruppeneinteilung der Histiozytome wurden pro Paraffinblock ein 3-4 μ m dicker Schnitt auf Star Frost-Objekträger (Menzel Gläser) aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) in einem Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-3, Life Science) gefärbt.

3.3 Lichtmikroskopische Gruppeneinteilung der Histiozytome

In Anlehnung an die Einteilung von COCKERELL und SLAUSON (1979) wurden die Histiozytome histologisch nach Menge und Muster der lymphozytären Infiltration im HE-Schnitt in 4 Gruppen eingeteilt. In der Gruppe 1 waren keine oder nur eine geringe Anzahl von infiltrierenden Lymphozyten im Tumorgewebe vorhanden. In Gruppe 2 lag eine mäßige, diffuse und in den Randbereichen eine teils noduläre, lymphozytäre Infiltration vor. Histiozytome der Gruppe 3 waren durch deutliche noduläre Infiltrate charakterisiert, die sich von der Subkutis bis ins Zentrum des Tumors ausbreiteten. In Gruppe 4 war die lymphozytäre Infiltration bereits soweit fortgeschritten, dass die Anzahl der Lymphozyten die der Tumorzellen überstieg.

3.4 Immunhistologie

Zum immunhistologischen Nachweis der Lymphozytendifferenzierungsantigene CD3 ϵ , CD21(like), CD4 und CD8 wurden Gefrierschnitte mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Für den Nachweis von myeloischem/histiozytärem Antigen und Lysozym wurden Paraffinschnitte verwendet.

3.4.1 Antikörper und Seren

Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper wurden, soweit keine anderen Angabe gemacht werden, in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) verdünnt. Die Angaben zu den Primärantikörpern sind in Tabelle 3 aufgeführt. Eine Übersicht der Antikörperkombinationen ist in Tabelle 4. dargestellt .

Tab. 3: Spezifität, Klon, Herkunftsspezies, Verdünnung und Bezugsquelle der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
CD3 ϵ	CD3-12	Ratte	1:400	Connex
caCD21(like)	CA2.1D6	Maus	1:500	Dr. P. Moore
caCD4	YKIX302.9.3.7.	Ratte	1:100	Dr. S. Cobbold
caCD8	Dog10-1-1	Maus	1:1000	Dr. C. Vogl
Lysozym	Polyklonal	Kaninchen	1:800	Dako
Myeloid/Histiocyte Antigen	MAC 387	Maus	1:1600	Dako

Tab. 4 : Übersicht der verwendeten Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper

Antigen	Primär-AK (Klon)	Sekundär -AK	Tertiär-AK- Detektions- -system	Vorbehandlung (Blocken)	Schnitte
CD3ε	CD3-12	biot. Kanin.- anti-Ratte Ig	ABC	keine	Gefrier- schnitte
ca CD21(like)	YKIX302.9.3.7.				
ca CD4	CA2.ID6	biot. Pferd-anti- Maus Ig			
ca CD8	Dog10-1-1				
Lysozym	Anti-Lysozym (polyklonal)	biot. Ziege- anti- Kanin. Ig		Protease-Vbh.	Paraffin- schnitte
Myeloisches / histiozytäres Antigen	MAC 387	Ratte-anti- Maus Ig	PAP	Protease-Vbh. (Rattenserum)	

AK=Antikörper, ca= kanines, biot=biotiniliert, Ig=Immunglobulin, Vbh.=Vorbehandlung

Die Antikörper gegen die kaninen Lymphozytenoberflächenmarker CD21 (like), CD4 und CD8 wurden von Dr. P. Moore (University of California, Davis, USA), Dr. S. Cobbold (University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien) und Dr. C. Vogel (GSF-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Als Sekundärantikörper wurde biotiniliertes Pferde-anti-Maus, Kaninchen-anti-Ratte oder Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin von der Firma Vector Laboratories bzw.

Ratte-anti-Maus Immunglobulin von der Firma Dianova verwendet (Tab. 4). Die Verdünnung betrug stets 9 µl/ml TBS.

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vector Laboratories, PK 4000) in einer Verdünnung von 9 µl Avidin und 9 µl Biotin /ml TBS sowie Peroxidase-anti-Peroxidase von der Maus (PAP, Dianova) in einer Verdünnung von 2 µl/ml TBS dienten als Tertiärantikörper (Tab. 4).

Für den Ansatz des Primärantikörpers gegen Lysozym wurde 5%iges Hundeserum (Tab. 3) und für die Proteasebehandlung bei MAC 387 10%iges Rattenserum (Tab. 4) verwendet.

3.4.2 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) zum Nachweis der Lymphozyten-spezifischen Antigene im Gefrierschnitt

In Anlehnung an die von HSU et al. (2000) beschriebene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode wurde folgendes Protokoll verwendet: Soweit nicht anders angegeben, wurden die Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Auftragen der Antikörper und für die dazwischen liegenden Waschschrte wurden die Objektträger auf ein Tablett gelegt, die Lösungen als liegender Tropfen auf das Gewebe pipettiert und nach der Inkubationszeit abgesaugt.

1. Trocknen der bei -70° C gelagerten Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min
2. Umgrenzung jedes Schnittes mit Hilfe eines hydrophoben Stiftes (Pap-Pen®)
3. Waschen der Schnitte in TBS, zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,03%igem H₂O₂ in TBS für 30 min
5. Waschen der Schnitte in TBS, dreimal für 5 Minuten
6. Auflegen der Objektträger auf ein Tablett

7. Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C
8. Waschen der Schnitte in TBS, dreimal für 5 Minuten
9. Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer für 30 Minuten
10. Waschen der Schnitte in TBS, dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur
11. Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex in einer feuchten Kammer für 30 Minuten
12. Waschen der Schnitte in TBS, dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur
13. Inkubation der Schnitte unter Rühren in einer Küvette mit frisch angesetzt und filtriertem 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) gelöst in 0,1 M Imidazol/HCL-Puffer mit 0,01% H₂O₂ für 10 Minuten
14. Waschen der Schnitte in TBS, dreimal für 5 Minuten
15. Waschen der Schnitte in Aqua bidest für 5 Minuten
16. Gegenfärben der Schnitte in Papanicolaou-Lösung (1:20 verdünnt in Aqua bidest) für 30-60 Sekunden
17. Bläuen der Schnitte für 5 Minuten in Leitungswasser
18. Waschen der Schnitte in Aqua bidest für 5 Minuten
19. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 Minuten in 50-, 70- 80- und 96%igem Alkohol, für zweimal 3 Minuten in 100%igem Isopropanol und für zweimal 5 min in Roti-Histol®
20. Eindecken der Schnitte mit Folie im Eindeckautomaten (Tissue Tec®)

3.4.3 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) zum Nachweis von Lysozym im Paraffinschnitt

Soweit nicht anders angegeben wurden die Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Auftragen der Antikörper und für die dazwischen liegenden Waschschrte befinden sich die Objektträger in Coverplates® (Life Science Int. GmbH) und Sequenza® Einsätzen (Shandon).

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte in Roti-Histol® dreimal für 5 Minuten, in Isopropanol zweimal für 5 Minuten und in 96%igem, 70%igem und 50%igem Alkohol je einmal für 3 Minuten
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5% H₂O₂ (30%) in Methanol (reinst) für 30 min
3. Waschen der Schnitte in TBS dreimal für 5 Minuten
4. Proteasebehandlung der Schnitte mit 0,05% Protease (Typ XXIV) gelöst in vorgewärmtem NaCl-PBS (pH 7,4) für 5 min bei 37° C
5. Abstoppen der Reaktion durch dreimaliges Waschen in eiskaltem PBS für 5 min
6. Einsetzen der Schnitte in Coverplates® (Life Science Int. GmbH) und Sequenza® Einsätze (Shandon)
7. Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4° C
8. 8. bis 20. wie bei 3.4.2

3.4.4 Protokoll der Immunhistologie (PAP-Methode) zum Nachweis des myeloischen/histiozytären Antigens im Paraffinschnitt

Zum Nachweis des myeloischen/histiozytären Antigens wurde die PAP-Methode verwendet. Das Protokoll entspricht weitgehend dem des Lysozym-Nachweises. Abweichend davon finden sich folgende Änderungen:

7. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers findet ein zehnminütiges Blocken mit 10%igem Rattenserum statt
11. Statt des Avidin-Biotin-Komplexes wird als Tertiärantikörper mit PAP von der Maus inkubiert

3.4.5 Kontrollen

Als Positivkontrolle für die Lymphozyten-spezifischen Antikörper wurden Milzschnitte eines Hundes (S592/99) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde TBS mit Ascites-Flüssigkeit von Balb-c-Mäusen anstelle des Primärantikörpers aufgetragen. Für den Nachweis von Lysozym und myeloischem/histiozytärem Antigen dienten Gewebeschnitte einer granulomatösen Entzündung mit zahlreichen Makrophagen vom Hund (T7766/00) als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde statt des Primärantikörpers der Kontrollantikörper T1, der gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten gerichtet ist (HIRSCHBERGER 1987), aufgetragen. Beim Nachweis von Lysozym wurde für die Negativkontrolle Kaninchenserum anstelle des Primärantikörpers verwendet.

3.4.6 Auswertung der Immunhistologie

Mit Hilfe eines Mikroskopes (IX 70, Fa. Olympus, Hamburg) mit einer eingesetzten Netzmikrometerplatte (U-OCMSQ10/10 Olympus, Hamburg), die beim 40er-Objektiv eine Zählfeld von 0,062 mm² begrenzt, wurde der Schnitt meanderförmig abgefahren und in jedem zehnten Feld die Anzahl der positiven Zellen gezählt. Anschließend

wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Zählfeld für jede Probe berechnet. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0,129 erfolgte die Umrechnung auf ein mm².

3.5 „Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling“- (TUNEL) Methode für den Nachweis von apoptotischen Zellen

Das kommerziell erhältliche „In Situ Cell Death Detection Kit, AP“ (Boehringer, Mannheim) wurde zum Nachweis von TUNEL-positiven Zellen im Tumorgewebe eingesetzt. Diese Methode dient der Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen in apoptotischen Zellen. Soweit nicht anders angegeben wurden die Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte in Roti-Histol® zweimal für 5 Minuten, in Isopropanol zweimal für 5 Minuten und in 96%igem und 70%igem Alkohol je einmal für 3 Minuten
2. Wässern der Schnitte in Aqua dest. für 5 Minuten
3. Vorbehandlung der Schnitte mit Proteinase K (20µg/ml in 10mM Tris-HCl, pH 7,4) für 25 Minuten
4. Waschen der Schnitte in PBS, zweimal für 5 Minuten
5. Auflegen der Objektträger auf ein Tablett und Umrandung des Gewebes mit einem hydrophoben Stift. (PAP-Pen®)
6. Vermischen der „Label Solution“ mit der „Enzyme Solution“ und pipetieren von 50 µl des so hergestellten TUNEL-Reaktionsgemisches auf jeden Gewebeschnitt
7. Abdecken des Gewebes mit einem Deckgläschen (Gelbond®) und Inkubation in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei 37°C

8. Dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS
9. Auftragen von 50 µl „Converter AP“ pro Gewebsschnitt
10. Abdecken des Gewebes mit einem Deckgläschen (Gelbond®) und Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei 37°C
11. Dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS
12. Auftragen von 2-5 Tropfen eines chromogenen Substrates (Fast Red®) pro Schnitt und Inkubation für 10 Minuten
13. Zweimaliges Waschen der Schnitte in PBS für 5 Minuten
14. Färben der Schnitte in Mayers Hämalaun (siehe Anhang) für 1 Minute
15. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 3 Minuten
16. Verbringen der Schnitte in PBS und Eindecken mit Glyceringelatine

Als Positivkontrolle für die TUNEL-Methode dienten Gewebeschnitte eines Rektumpolypen, der im HE-Schnitt zahlreiche apoptotische Zellen mit kondensiertem Chromatin aufwies, von einem 13jährigen Schäferhundes (T9734/99). Als Negativkontrolle wurde statt des TUNEL-Reaktionsgemisches lediglich die „Label-Solution“ aufgetragen.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit der gleichen Vorgehensweise wie bei der Immunhistologie (siehe 3.4.6.). Abweichend wurden hier jedoch in jedem 10ten Zählfeld die TUNEL-positiven Zellen, die TUNEL-positiven Zellen mit morphologischen Merkmalen der Apoptose und die Gesamtzahl aller Zellen pro Feld ausgezählt. So konnte der Quotient der TUNEL-positiven Zellen/Gesamtzellzahl und der Quotient der TUNEL-positiven Zellen mit morphologischen Merkmalen/Gesamtzellzahl errechnet werden.

3.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

3.6.1 Allgemeine Maßnahmen

Um DNA-Kontaminationen, Verunreinigung mit RNasen und Verschleppungen zwischen einzelnen Proben zu vermeiden, wurden bei den molekularbiologischen Arbeitsschritten folgende Maßnahmen berücksichtigt:

1. Tragen von Latex-Einweghandschuhen, die zwischen bestimmten Arbeitsschritten gewechselt wurden
2. Verwendung von Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,1%)-behandeltem, und autoklaviertem Aqua bidest (siehe Anhang)
3. Autoklavieren von Gebrauchslösungen, Instrumenten und Plastikwaren für 30 min bei 0,4 atü
4. Verwendung von sterilen RNasen- und DNasen-freien, gestopften Pipettenspitzen (Biozym) und von sterilen, RNasen- und DNasen-freien PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym)
5. Aliquotierung von Reagenzien und Proben in kleinen Mengen
6. Räumliche Trennung und Verwendung von separaten Instrumenten für die RNA-Isolierung, das Ansetzen der RT-PCR und die Detektion der PCR-Amplifikate
7. Einsatz von Negativekontrollen bei der RNA-Isolierung (Tissue Tec® OCT-Gefrierblöcke, in die kein Gewebe eingebettet wurde) und bei der RT-PCR (DEPC-behandeltes Aqua bidest)

8. Regelmäßiges Reinigen des Arbeitsplatzes und der Instrumente mit 10%iger Natriumhypochloridlösung
9. Die Präparationsschritte der RT-PCR wurden auf Eis durchgeführt. Temperatur-empfindliche Reagenzien und Proben wurden bei ihrer Verwendung in eisgekühlten Metallblocks oder Kühlracks abgestellt

3.6.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das kommerziell erhältliche Trizol-Reagenz® (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieses Protokolls basiert auf der RNS-Isolierungs Methode nach CHOMEZYNSKI und SACCHI (1987). Von den wie in Kap. 3.2.1 hergestellten Gefrierblöcken wurden zehn 20µm dicke Schnitte nacheinander an einem gründlich gereinigten Kryotom (Reichert-Jung) hergestellt, mit einer gereinigten und autoklavierten Pinzette von der Kryotomklinge gehoben und in ein zuvor mit 1ml Trizol® gefülltes 2 ml Eppendorfgefäß gesteckt. Die Schnitte wurden unter Schütteln des Gefäßes gelöst. Um zu überprüfen, ob es zu Verunreinigungen kommt wurden zwischen zwei Proben reine OCT-Blöcke ohne eingebettetes Gewebe geschnitten und in allen nachfolgenden Schritten mitverarbeitet. Die Gefrierschnitte für die Immunhistologie wurden direkt im Anschluss aufgezogen, um für die verschiedenen Untersuchungen Gewebe aus der gleichen Lokalisation zu gewinnen. Die weiteren Schritte der RNA-Isolierung erfolgten in Anlehnung an GRÖNE et al. (1999) und die Angaben des Herstellers in folgender Weise:

1. Inkubation des Gewebes in einem ml Trizol-Reagenz® für mindestens 5 min bis keine ungelösten Gewebspartikel mehr zu erkennen sind
2. Zugabe von 300 µl Chloroform, 15 Sekunden kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes anschliessend 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
3. Zentrifugation bei 12000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Auftrennung des Gemisches in eine wässrige und eine organische Phase

4. Entnahme der oberen RNA-haltigen, wässrigen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß und Wiederholung der Schritte 2. und 3.
5. Entnahme der oberen RNA-haltigen, wässrigen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß, Zugabe von 700µl 100% Isopropanol (Roth) und Inkubation bei –20°C über Nacht zur Ausfällung der RNA
6. Zentrifugation bei 12000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Herstellung eines RNA-Pellets
7. Verwerfen des Überstandes und Waschen des RNA-Pellets durch Zugabe von 600 µl 75%igem Ethanol
8. Zentrifugation bei 12000 x g für 5 Minuten
9. Verwerfen des Überstandes und Überschichtung des RNA-Pellets mit 150 µl 75%igem Ethanol
10. Lagerung des Ethanol-überschichteten Pellets bei –80°C bis zur Weiterverarbeitung

Vor der Durchführung der RT-PCR wurden die RNA-Pellets wie folgt verarbeitet. Nach einer Zentrifugation bei 10 000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Alkohol vorsichtig abpipettiert und das Reaktionsgefäß für etwa 10 Minuten mit der Öffnung nach unten auf ein sauberes Papierhandtuch gestellt, sodass der verbliebene Alkohol abfließen und verdunsten kann. Dabei durfte das der Wand anhaftende Pellet nicht vollständig austrocknen, um seine Löslichkeit nicht herabzusetzen. Das Pellet wurde anschließend in 50µl DEPC-behandeltem Aqua bidest durch mehrfaches Auf- und Abpipetieren gelöst und die RNA-Konzentration der Lösung mit einem Spektralphotometer (GenQuant II, Pharmacia Biotech) bei 260 nm gemessen. Um eine einheitliche Ausgangsmenge der RNA zu erreichen wurde von allen Proben eine Verdünnungen mit der Konzentration von 100ng/µl hergestellt.

3.6.3 DNase-Behandlung

Um eine DNA-Verunreinigung auszuschließen wurde der Reversen Transkription eine DNase-Behandlung vorangesetzt (GRÖNE et al. 1999). Dazu wurden in 0,5 ml PCR-Tubes (Biozym) 6,5 µl der RNA Lösung mit 3,25 µl eines Master-Mix aus MnCl₂, 10x PCR-Puffer, DNase und RNase-Inhibitor in einem Multicycler ®PT 200 (Biozym Diagnostik) inkubiert (Tab. 5). Kleinere Probenmengen sollten nicht verwendet werden, da sich geringere Flüssigkeitsvolumina ungünstig auf die Reaktionsbedingungen auswirken. Nach der DNase-Behandlung erfolgte innerhalb kurzer Zeit die reverse Transkription, um eine Degradation der RNA auf Grund längerer Aufbewahrung des Reaktionsproduktes zu vermeiden.

Tab. 5: Ansatz zur DNase-Behandlung von 6,5 µl RNA

Reagenzien	Menge	Endkonzentratrion
MnCl ₂ (10mM)	1,0 µl	1mM
10x PCR-Puffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl)	1,0 µl	1x PCR-Puffer
DNase I, RNase-frei, aus Rinderpankreas (10 U/µl)	1,0 µl	1 U/µl
RNase-Inhibitor (40U/µl)	0,25 µl	1U/µl
RNA in Aqua bidest (100ng/µl)	6,5 µl	67 ng/µl

Die DNase-Behandlung fand unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

37°C für 10 Minuten

75°C für 5 Minuten

4°C bis zur Entnahme der Proben

3.6.4 Reverse Transkription

Die cDNA Herstellung durch Reverse Transkription (RT) wurde mit dem „GeneAmp RNA PCR Core Kit“ (Perkin Elmer) im Multicycler® PT200 (Biozym Diagnostiks) durchgeführt. Die Reaktion fand in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostiks) statt. Von dem aus der DNase-Behandlung hervorgegangenen Gesamtvolumen von 9,75 µl wurden in diesem Reaktionschritt 1,5 µl benötigt um 10 µl cDNA zu herzustellen. Je nach gewünschter cDNA-Menge wurden die Volumina der Reaktionskomponenten (Tab. 6) multipliziert.

Tab. 6: Ansatz zur Herstellung von 10µl cDNA-Lösung

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
MgCl ₂ , 25 mM	2,0µl	5mM
10x PCR-Puffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl)	1,0µl	1x PCR-Puffer
dATP (10mM)	1,0µl	1mM
dCTP (10mM)	1,0µl	1mM
dGTP (10mM)	1,0µl	1mM
dTTP (10mM)	1,0µl	1mM
Rnase-Inhibitor (20U/µl)	0,5µl	1U/µl
Murine Reverse Transkriptase (50U/µl)	0,5µl	2,5U/µl
Random Hexamers (50µM)	0,5µl	2,5µM
DNase-behandelte RNA (Produkt aus 3.6.3)	1,5µl	10ng/µl

dATP=Desoxyadenintriphosphat, dCTP=Desoxycytosintriphosphat,
dGTP=Desoxyguanintriphosphat, dTTP=Desoxythymintriphosphat

Die RT-Reaktion fand unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

20°C für 8 Minuten

42°C für 15 Minuten

96°C für 5 Minuten

5°C für 5 Minuten

4°C bis zur Entnahme der Proben

Die aus dieser Reaktion hervorgehende cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.6.5 Konventionelle PCR zur Überprüfung der RNA-Isolierung

Um die Reinheit der RNA-Isolierung zu überprüfen, wurde die cDNA der Gewebeproben und der Negativkontrollen in eine PCR mit dem GeneAmp RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer) und spezifischen Primern für das house-keeping Gen Aktin (Tab. 9) eingesetzt (GRÖNE et al. 1998). Die Reaktion fand im Multicycler® PT200 (Biozym Diagnostiks) in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostiks) statt. Die Komponenten eines Reaktionsansatzes sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Ansatz der konventionellen PCR-Reaktion

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
Aqua bidest	32,75	
10 x PCR-Puffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl)	4µl	0,8 x PCR-Puffer
MgCL ₂ (25mM)	2µl	1mM
Sense Primer (15pmol/µl)	0,5µl	0,15pmol/µl
Antisense Primer (15pmol/µl)	0,5µl	0,15pmol/µl
Ampli-Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25µl	0,025 U/µl
cDNA (Produkt aus 3.6.4.)	10µl	

Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

94°C für 1 Minute

40 Zyklen: 94°C für 1 Minute/ 59,5°C für 2 Minuten/ 72°C für 1 Minute

72°C für 5 Minuten

4°C bis zur Entnahme der Proben

3.6.6 Semiquantitative Echtzeit-PCR zum Nachweis der Zytokin und iNOS mRNA-Expression

Die semiquantitative Echtzeit-PCR wurde mit dem LightCycler® (Roche) sowie einem PC mit Pentium-Processor, Windows NT 4.0 als Betriebssystem und der LightCycler Software Version 3.5. durchgeführt. Es wurde das gebrauchsfertige Kit, LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I® (Roche) verwendet. In dem aus zwei Komponenten anzufertigenden Reaktionsgemisch sind eine Heiß-Start Taq-DNA-Polymerase, Nukleotide, der Fluoreszenz Farbstoff SYBR-Green sowie Reaktionspuffer und 10mM MgCl₂ enthalten. Weiterhin werden eine 25mM MgCl₂ Lösung und steriles H₂O getrennt zur Verfügung gestellt, um eine individuelle Einstellung der MgCl₂ Konzentration zu ermöglichen. Die Reagenzien des Kits wurden mit dem gewünschten Primerpaar nach Angaben des Herstellers zu einem Master Mix vermischt, 18µl davon in spezielle Glaskapillaren, die LightCycler Capillaries® (Roche), vorgelegt und 2µl der Probe hinzupipettiert. Zur Handhabung der Glaskapillaren stand ein spezieller Metallkühlblock zur Verfügung (Roche). Die Anteile der Reaktionskomponenten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Reaktionsansatz für die Echtzeit-PCR:

Reagenzien	Menge
H ₂ O, steril PCR grade	11,8 µl
MgCL ₂ (25mM)	3,2 µl
LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I (10 x)	2 µl
Sense-Primer (siehe Tab.8)	0,5 µl
Antisense-Primer (siehe Tab.8)	0,5 µl
cDNA (Produkt aus 3.6.4.)	2 µl

Nach Zugabe aller Proben wurden die Kapillaren verschlossen, zur Verteilung der Reagenzien und Senkung der Flüssigkeit für einige Sekunden zentrifugiert und in das Rondell des LightCyclers eingesetzt. Das Temperaturprofil und die Meßzeitpunkte der Reaktion wurden eingegeben und die Position sämtlicher Proben innerhalb des Probenkarussells definiert. Um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu erreichen wurden alle 30 Histozytome der Gruppen 1, 2, 3 und 4 in einem Lauf eingesetzt. So verblieben lediglich 2 weitere Probenpositionen für eine positive und negative Kontrolle. Die Quantifizierung mußte deshalb mit Hilfe einer externen Standardkurve vorgenommen werden.

3.6.6.1 Primer

Für den Nachweis der mRNA der house-keeping Gene Aktin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) und der Zytokine Interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , Interferon (IFN) γ und Transforming Growth Faktor (TGF) β wurden die in der folgenden Tabelle 9 aufgeführten Primer verwendet.

Tab. 9: Primer, interne Bezeichnung, Sequenz, GenBank-Accession-Nr. und Position der Primer sowie Konzentration der Gebrauchslösung

Primer	Bez.	Sequenz (5` - 3`)	Acc.-Nr., Position	Konz.
β-Aktin S	p7	CGT TGC TAT CCA GGC TGT GC	M10277, 2064-2083	7,5 pmol/μl
β-Aktin AS	p8	GTA GTT TCG TGG ATG CCA CA	M10277, 2593-2574	7,5 pmol/μl
GAPDH S	p42	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	BC014085, 1225- 1244	7,5 pmol/μl
GAPDH AS	p43	GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT	BC014085, 1452- 1433	7,5 pmol/μl
IL-1β S	p69	TCC AAT GTG AAG TGC TGC TGC	Z70047, 14-34	7,5 pmol/μl
IL-1β AS	p70	TAT GAG TTA GAC AGC ACC AGG	Z70047, 336-316	7,5 pmol/μl
IL-2 S	p71	AGA TGG AGC AAT TAC TGC TGG	U28141, 139-159	7,5 pmol/μl
IL-2 AS	p44	ATT CTG TGG CCT TCT TGG GCG TGT	U28141, 258-235	7,5 pmol/μl
IL-6 S	p54	GCA AAG AGG CAC TGG CAG AA	U12234, 284-303	7,5 pmol/μl
IL-6 AS	p22	TTC TTG TCA AGC AGG TCT CC	U12234, 385-366	7,5 pmol/μl
IL-8 S	p29	ACT TCC AAG CTG GCT GTT GC	D28772, 39-58	7,5 pmol/μl
IL-8 AS	p30	GGC CAC TGT CAA TCA CTC TC	D28772, 210-191	7,5 pmol/μl
IL-10 S	p51	CCT GGG TTG CCA AGC CCT GTC	U338433, 235-255	3,75 pmol/μl
IL-10 AS	p32	ATG CGC TCT TCA CCT GCT CC	U338433, 446-427	3,75 pmol/μl

Fortsetzung Tab. 9:

Primer	Bez.	Sequenz (5' - 3')	Acc.-Nr., Position	Konz.
IL-12 S	p77	CAC CTG CCA TAC CCC TGA AG	U49100, 144-163	7,5 pmol/μl
IL-12 AS	p78	TGA CCC TCT CTG CTG AAA GT	U49100, 541-522	7,5 pmol/μl
TGFβ S	p45	TTC CTG CTC CTC ATG GCC AC	L34956, 826-854	3,75 pmol/μl
TGFβ AS	p46	GCA GGA GCG CAC GAT CAT GT	L34956, 1218-1199	3,75 pmol/μl
TNFα S	p23	CCA AGT GAC AAG CCA GTA GC	Z70046, 32-51	7,5 pmol/μl
TNFα AS	p24	TCT TGA TGG CAG AGA GTA GG	Z70046, 305-286	7,5 pmol/μl
IFNγ S	p73	GCA AGT AAT CCA GAT GTA TCG	S41201, 67-87	7,5 pmol/μl
IFNγ AS	p36	TTA TCG CCT TGC GCT GGA CC	S41201, 349-330	7,5 pmol/μl
iNOS S	p127	AGA CAC ACT TCA CCA CAA GG	AF077821, 369-388	7,5 pmol/μl
iNOS AS	p95	TGC TTG GTG GCG AAG ATG AGC	AF077821, 653-633	7,5 pmol/μl

Bez.= interne Bezeichnung, Acc.-Nr.= GenBank-Accession-Number, S= Sense-Primer, AS= Antisense-Primer

Es handelt sich, bis auf p69, p70, p71 und p73 (persönliche Mitteilung Stephanie Markus), um bereits publizierte Oligonukleotide (GRÖNE et al 1998; MARKUS et al. 2002). Bei den für Aktin und GAPDH angegebenen „Accession-Numbers“ handelt es sich um humane Sequenzen. Im Fall der Aktin-Primer liegt zwischen den beiden Primer-Positionen ein Intron von 95bp-Länge, das bei der Kalkulation der erwarteten Basenpaarlänge des Amplifikates abgezogen werden muß. Die Primer p95 und p127 wurden anhand einer publizierten kaninen cDNA Sequenz (GenBank™ /EMBL, NCIB) mit Hilfe des „primer designer program“ (Sience and Educational Software, State Line, PA) erstellt. Die Synthese der meisten Primer wurde bei MWG-Biotech

AG in Auftrag gegeben (Reinigung: HPSF, Maßstab: 0,2µmol), lediglich die Primer p69, p70, p71, p73, p77 und p78 wurden bei GIBCO BRL, Life Technologies bestellt. Die gelieferten Lyophilisate der Primer wurden in der Menge Aqua bidest DEPC, die nach Angaben des Herstellers benötigt wird, um eine Konzentration von 100pmol/µl zu erreichen, gelöst. Zur Überprüfung der Konzentration wurde die Lösung im Spektralphotometer (Gen Quant II, Pharmacia Biotech) gemessen. Ausgehend von der gemessenen Konzentration wurden Gebrauchslösungen von 15pmol/µl hergestellt. Vor der Durchführung einer Versuchsreihe wurden Sense-Antisense-Gemische des Primerpaares hergestellt und auf die benötigte Konzentration eingestellt.

3.6.6.2. Temperaturbedingungen und Messpunkte

Da für alle LightCycler-PCR-Reaktionen eine Heißstart DNA-Polymerase verwendet wurde, war der Amplifikation eine 10-minütige Denaturierung bei 95° C vorausgesetzt. In der Amplifikationsphase stand am Anfang jedes Zyklus eine Denaturierungszeit von 15 Sekunden bei 95°C. Die gewählte Temperatur der anschließenden Primeranlagerung („Annealing“) variierte bei den unterschiedlichen Primerpaaren. Bei der Mehrzahl der PCR-Protokolle wurde an dieser Stelle eine „touch-down-PCR“ angewandt, bei der sich innerhalb der ersten PCR-Zyklen die „Annealing“-Temperatur in Schritten von 0,7°C senkt bis eine tiefer als die Ausgangstemperatur liegende Zieltemperatur erreicht ist. Die Elongationszeit am Ende des PCR Zyklus wurde je nach Basenpaarlänge des erwarteten Amplikons unterschiedlich lang eingestellt. Zur Quantifizierung der SYBR Green-markierten DNA-Doppelstränge wurde in jedem Zyklus eine einmalige Fluoreszenzmessung durchgeführt, die in der Regel bei 72°C in der Elongationszeit statt fand. Bei einigen Protokollen war es jedoch notwendig nach der Elongationszeit eine Fluoreszenzmessung bei höherer Temperatur vorzunehmen, um die Detektion von unspezifischen Doppelsträngen zu vermeiden. Zyklenzahl, „Annealing“- und Elongationsbedingungen sowie Temperatur der Fluoreszenzmessung sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Nach der Amplifikationsphase wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt um die Spezifität der PCR-Amplifikate zu

überprüfen. Zu diesem Zweck wurde nach einer kurzen Denaturierung bei 95°C für 0 Sekunden die Temperatur für 15 Sekunden auf 65°C eingestellt, um alle Amplifikate in doppelsträngige Form zu bringen. Dann wurde die Temperatur langsam, in Temperaturschritten von 0,1°C pro Sekunde auf 95°C (98°C bei TGFβ) erhöht, um ein Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge zu erreichen. Während der Temperaturerhöhung wurde eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung durchgeführt, um die Abnahme der Fluoreszenz zu dokumentieren. Am Ende des Laufes wurde die Temperatur schließlich für 30 sec auf 40°C gekühlt. Mit Ausnahme des Programmschrittes zur Ermittlung der Schmelzkurve wurde für alle Temperaturänderungen die maximale Geschwindigkeit von 20°C/sec gewählt.

Tab. 10: Zeit- und Temperaturbedingungen der Reaktion und Temperatur zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung bei der PCR im LightCycler

	Annealing	Elongation	Zyklen	Meßtemp.
Aktin	57°C / 6sec	72°C / 17sec	50	88°C
GAPDH	td 69°-61°C / 6sec	72°C / 12sec	50	72°C
IL-1	td 70°-60°C / 6sec	72°C / 12sec	45	83°C
IL-2	td 70°-60°C / 6sec	72°C / 6sec	60	72°C
IL-6	td 69°-61°C / 8sec	72°C / 8sec	45	72°C
IL-8	60°C / 6sec	72°C / 8sec	45	72°C
IL-10	58°C / 6sec	72°C / 10sec	45	72°C
IL-12	td 70°-60°C / 6sec	72°C / 17sec	55	84°C
TNFα	td 69°-60°C / 6sec	72°C / 12sec	45	72°C
TGFβ	td 70°-66°C / 6sec	72°C / 17sec	50	72°C
IFNγ	td 70°-60°C / 6sec	72°C / 12sec	55	72°C
iNOS	td 70°-60°C / 6sec	72°C / 11sec	45	72°C

td= touch down PCR mit 0,7°C Temperatursenkung pro Zyklus

3.6.6.3 Positivkontrollen und Standardreihen

Als Positivkontrolle für die Zytokin-PCR wurden Concanavalin A- stimulierte kanine Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut verwendet. Nach Isolation der Lymphozyten mit 5%iger Dextranlösung und anschliessender Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit einem Lysispuffer wurden die Zellen in serumhaltigem „Eagle`s Minimal Essential Medium“ mit Earle`scher Salzlösung suspendiert und mit Concanavalin A-Lösung in eine Gewebekulturschale (Greiner Labortechnik) verbracht. Dann erfolgte eine Inkubation für 16h bei 37°C und 5% CO₂. Zur RNA-Isolierung mittels Trizol Reagenz[®] wurde der zellhaltige Überstand aus der Kulturschale abpipettiert und davon ein Zellpellet hergestellt. Um die am Boden der Zellkulturschale verbliebenen Lymphozyten mit aufzunehmen, wurde ein ml Trizol Reagenz in die Zellkulturschale gegeben, nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wieder entnommen und auf das zuvor hergestellte Zellpellet gegeben. Anschließend wurde die RNA-Isolierung wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben fortgesetzt. Für den Nachweis der iNOS mRNA dienten Gefrierschnitte aus der Haut eines an Leishmaniose erkrankten Hundes mit herdförmiger granulomatöser Dermatitis (T8766/98) als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle für alle PCR-Reaktionen wurde DEPC-behandeltes Aqua bidest eingesetzt.

Um eine Quantifizierung mit dem LightCycler zu ermöglichen müssen mindestens drei Positivkontrollen definierter Konzentration mitgeführt werden, zu denen die unbekannten Proben in Verhältnis gesetzt werden können. Da in diesem Fall keine Probe mit bekannter Kopienzahl der gesuchten RNA-Sequenz zur Verfügung stand, wurde eine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Eine Kontrollprobe, die in der Messung mit dem Spektralphotometer eine hohe RNA-Konzentration aufwies, wurde unverdünnt in die DNase Behandlung und Reverse Transkription eingesetzt. Von der gewonnen cDNA wurde eine zweifache Verdünnungsreihe in Aqua bidest DEPC hergestellt. Mindestens drei Stufen dieser Verdünnungsreihe wurden in jedem LightCycler-Lauf mitgeführt, um zu ermöglichen, dass den unbekannten Proben ein relativer Zahlenwert zugeordnet werden kann. Da die Kapazität des LightCyclers von 32 Proben dies nicht immer erlaubte, bestand die Möglichkeit die Daten der

Verdünnungsreihe als Standardkurve zu speichern. Bei einem späteren Versuch genügte es, nur eine Verdünnungsstufe dieser Reihe mit definiertem Zahlenwert mitzuführen und die Daten als externe Standardkurve zu importieren.

3.6.6.4 Auswertung der Light Cycler PCR

Die Echtzeit-PCR mit dem LightCycler ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Amplifikate durch eine einmalige Fluoreszenzmessung in jedem Zyklus der Amplifikationsphase sowie die Überprüfung der Spezifität des PCR-Produktes durch eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung während der Schmelzkurvenanalyse. Der in diesem Protokoll verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green besitzt die Eigenschaft sich unabhängig von der Nukleinsäuresequenz an DNA-Doppelstränge zu lagern und ein Fluoreszenzsignal abzugeben welches bei 530 nm (Detektionskanal F1) von einem Fluorimeter aufgenommen wird. Da in der PCR je nach Ausgangsmenge der gesuchten Sequenz von Zyklus zu Zyklus die Anzahl spezifischer Amplifikate zunimmt, kann durch die Fluoreszenzmessung am Ende der Elongationszeit, wenn die DNA in doppelsträngiger Form vorliegt, ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert und als Kurve graphisch dargestellt werden. Die Zyklenzahl an der sich diese Kurve erstmals über die Hintergrundfluoreszenz erhebt („Crossing Point“) läßt Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der gesuchten DNA-Sequenz zu, da bei Proben mit einer hohen Ausgangsmenge der exponentielle Anstieg der Amplifikate bereits nach wenigen Zyklen zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal führt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve die aus 3 Stufen einer cDNA-Verdünnungsreihe hergestellt wurde (Kap. 3.6.6.3.). Es wurde die „Fit Point Methode“ angewandt, bei der der Benutzer manuell eine bestimmte Linie setzt, unterhalb derer die Fluoreszenz als unspezifischer Hintergrund betrachtet wird („Noise Band“) und die alle Kurven am Beginn des logarithmierten linearen Anstiegs schneidet („Crossing Line“). Es wurden dann 2 „Fit Points“, zwei Kurvenschnittpunkte innerhalb der logarithmierten linearen Phase, gesetzt. Anhand der so festgelegten Daten wird von der LightCycler-Software die Standardkurve errechnet. Den unbekannten Proben werden mit Hilfe der

Standardkurve die dem „Crossing Points“ entsprechenden Ausgangskonzentrationen automatisch zugeordnet.

Um die Spezifität des PCR-Produktes zu überprüfen, wurde im Anschluß an die PCR eine Schmelzkurve erstellt, indem die Fluoreszenz jeder Probe im Verlauf eines kontinuierlichen Temperaturanstieges gemessen wird. Durch die temperaturbedingte Auftrennung der DNA-Doppelstränge werden zunehmend SYBR Green-Moleküle frei, was in einem Abfall der Fluoreszenz resultiert. Je nach Basenpaarlänge und GC-Anteil sowie Salz- und Formamidkonzentration der Lösung besitzen DNA-Doppelstränge eine bestimmte Schmelztemperatur. Deshalb sollte, wenn das spezifische PCR-Produkt in möglichst reiner Form vorliegt, bei dieser bestimmten Temperatur die Fluoreszenz abrupt abfallen. Es wurde die polynomiale Rechenmethode ohne Hintergrundkorrektur verwendet. Für die graphische Darstellung der Fluoreszenzabnahme wurden die sogenannten „Melting Peaks“, Gipfel-förmige Kurven auf Höhe der spezifischen Temperatur, ausgewählt. Wenn im SYBR Green-Format bei der Schmelzkurvenanalyse mehreren Gipfel oder Gipfel bei der falschen Temperatur zu sehen sind, ist dies eine Hinweis auf unspezifische Fehlbindungen der Primer oder Primerdimere. In diesem Fall können die in der Amplifikationphase gemessenen Fluoreszenzdaten nicht zur Quantifizierung verwendet werden, da die SYBR Green-Fluoreszenz am Ende der Elongation nicht nur von dem gesuchten Amplifikat sondern auch von unspezifischen Doppelsträngen ausgeht. Zur Bestätigung der Spezifität der LightCycler PCR wurde für jedes Primerpaar das PCR-Produkt einer Probe (Histiozytom T8520/99) zur Aufreinigung und Sequenzierung (Comfort Read) bei der Firma MWG Biotech eingesandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit den Nukleinsäuresequenzen der GenBank™ / EMBL, NCIB verglichen.

Die PCR-Läufe von Einzelproben im LightCycler wurden einmalig durchgeführt. Wegen des begrenzten Probenumfangs des Light Cyclers konnten nur 32 Proben in einem Lauf untersucht werden, wodurch dreifache Standardreihen nicht zu realisieren waren. Außerdem waren die PCR-Kinetiken der verschiedenen Primerpaare nicht identisch. Die semiquantitativen Meßergebnisse sind deshalb nicht

als absolute Einzelwerte zu interpretieren und wurden nur im Gruppenvergleich ausgewertet.

3.6.7 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der konventionellen PCR, die zur Überprüfung der RNA-Isolierung erfolgte, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Ebenso, um die Basenpaarlänge der LightCycler Amplifikate zu kontrollieren, wurden exemplarisch Positivkontrollen, die zur Erstellung der Standardkurven dienten auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Für die Herstellung eines 2%igen Gels wurden 1,8 g Agarose (Gibco BRL) mit 91 ml TBE-Puffer (siehe Anhang) in einer Haushaltsmikrowelle erhitzt. Nach leichter Abkühlung wurden 1,6 µl Ethidiumbromid (Boehringer) zugegeben und in die Einsätze der Elektrophoresekammer gegossen. Nachdem das Gel bei 4°C fest geworden war, wurden 15 µl des PCR Produktes mit 3µl Bromphenol-Laufpuffer (Advanced Biotechnologies LTD) gemischt und in die Taschen des Gels pipetiert. In die äußeren Geltaschen wurde eine 100bp-Leiter (Advanced Biotechnologies LTD) aufgetragen, die es ermöglichte die Basenpaarlänge der Amplifikate abzulesen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 6V/cm und einer maximalen Stromstärke von 500mA für mindestens 24 Minuten. Auf einem UV Transilluminator bei 312 nm wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die photographische Dokumentation fand mit einem Instant-Camera-System (Polaroid MP4) und 667 Schwarz-Weiß Instantfilm Kassetten (Polaroid) statt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung sowie die Anfertigung graphischer Darstellungen erfolgte auf den Rechnern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin, Dr. K. Failing, der Justus-Liebig-Universität. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) durchgeführt. Mit dem Programm PlotIT für Windows, Version 3.20h (Eisensmith, 1993) wurden die graphischen Darstellungen erzeugt. Bei der Auswertung von Zellzahlen pro Flächeneinheit in den

verschiedenen Tumorgruppen wurden zur Datenbeschreibung arithmetrischer Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima und Stichprobenumfänge ausgewertet. Auf Grund der rechtsschiefen Verteilung der quantitativen Merkmale wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt und geometrische Mittelwerte sowie Streufaktoren dargestellt. Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Bei signifikanten Resultaten wurden die Gruppen anschließend paarweise mit dem Tukey-Verfahren verglichen. Beim Gruppenvergleich der relativen Zytokin bzw. iNOS mRNA Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi angewandt. Die Datenbeschreibung erfolgte durch Angabe der Mediane, der Quartile sowie der Minima und Maxima, dargestellt im Box- und Whisker-Plot. Die Expression des „housekeeping-genes“ im Verlaufe der Tumorregression wurde mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1. Kennzeichen der untersuchten Hunde, Makroskopie der Histiozytome und Ergebnisse der Blutuntersuchung

Die 30 Hunde unterschiedlicher Rassen, die für die Untersuchung zur Verfügung standen, waren im Alter von 5 Monaten bis zu 13 Jahren ($\bar{\varnothing}$ 2,6 Jahre) und je zu 50% männlichen bzw. weiblichen Geschlechts. Die Proben wurden in einem Zeitraum von 1,5 Jahren gesammelt (02.12.1998 bis 29.05.00). Von den 30 Histiozytomen waren 11 an den Gliedmaßen lokalisiert und 16 Tumoren befanden sich im Kopfbereich, davon sieben an den Ohren. Nur 3 Histiozytome wurden am Rumpf entfernt. Die vier Kontrollhunde der Rasse Beagle waren im Alter von 5 bis 10 Jahren ($\bar{\varnothing}$ 7 Jahre). Ein Tier war weiblichen und drei waren männlichen Geschlechts. Es wurde eine 4 mm Stanze aus dem Inguinalbereich der Hunde entnommen. Die durchschnittliche Größe der Histiozytome aus der Gruppe 1 betrug 0,68 cm (0,4 cm bis 1 cm) im Durchmesser. In Gruppe 2 betrug der mittlere Durchmesser der Histiozytome 0,86 cm (0,6 cm bis 1 cm) und in Gruppe 3 1,03 cm (0,4 cm bis 1,4 cm). Die Tumoren der Gruppe 4 wiesen im Schnitt einen Durchmesser von 0,72 cm (0,4 cm bis 0,9 cm) auf. Genauere Angaben zu Rasse, Geschlecht, Alter und Tumorlokalisation sind den Tabellen 1 und 2 im Kapitel 3 zu entnehmen. In den Abbildung 1 bis 3 sind beispielhaft makroskopische Bilder von Histiozytomen dargestellt. Alle Hunde waren laut Vorbericht ohne klinische Symptome und zeigten sich bei einer Allgemeinuntersuchung ohne besonderen Befund. Bei der Untersuchung einer EDTA-Blutprobe jedes Hundes mit einem automatisierten Hämatologiesystem zeigte die Mehrzahl der Hunde keine Auffälligkeiten im roten und weißen Blutbild. Bei vier Hunden konnte eine geringgradige Eosinophilie von $1,41 \times 10^9$ Zellen/L (T594/00), $0,89 \times 10^9$ Zellen/L (T6646/99), $1,3 \times 10^9$ Zellen/L (T6195/99) und $1,6 \times 10^9$ Zellen/L (T3901/99) im Differenzialblutbild festgestellt werden. Ein Hund (T54935/99) zeigte eine Leukozytose von 36×10^9 Zellen/L. Ein Hund (T4296/99) wies eine geringgradige Leukopenie von $5,4 \times 10^9$ Zellen/L und eine erniedrigte Erythrozytenzahl von $4,5 \times 10^{12}$ Zellen/L auf.

Abb.1:

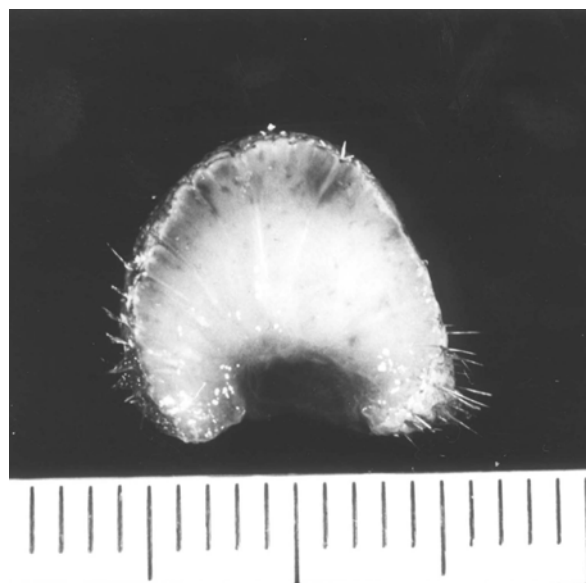
Histiozytom am der Zehe eines 8 Monate alten, weiblichen Staffordshire Terriers (T1895/99).

**Abb.2:**

Histiozytom am lateralen Tarsus eines 6 Monate alten, männlichen Boxer-Mischlings (T2058/99) mit großflächiger Ulzeration.

**Abb.3:**

Homogene, grau-weiße Schnittfläche eines Histiozytoms (T1895/99). Die diffuse Tumorzellinfiltration reicht von der Subkutis bis an die Epidermis, die Adnexe sind nahezu vollständig verdrängt. Der Abstand zwischen zwei großen Teilstrichen des Lineals beträgt 1cm.



4.2 Gruppenzuordnung der Histiozytome

Ausgehend vom lichtmikroskopischen Bild im HE-Schnitt wurde eine morphologische Einteilung der Tumoren in 4 Stadien vorgenommen, die sich an der Gruppeneinteilung von COCKERELL und SLAUSON (1979) orientierte. Dabei wurden die Anzahl und das Verteilungsmuster der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten in Bezug zur Tumorzellpopulation der Klassifizierung zu Grunde gelegt (Tab. 11). Das Ausmaß der granulozytären Infiltration wurde bei der Gruppeneinteilung nicht berücksichtigt.

Tab. 11: Gruppen 1-4: Verteilung der lymphozytären Infiltration, Probenzahl (n), und Tagebuchnummer der Proben in den einzelnen Gruppe.

Gruppe	lymphozytäre Infiltration	n	Tagebuchnummer der Probe
1	keine bis geringgradige diffuse Infiltration	6	T1895/99, T6195/99, T6196/99, T6646/99, T594/00, T811/00
2	mittelgradige diffuse Infiltration im Zentrum, noduläre Infiltrate in der Peripherie	5	T3222/99, T4257/99, T1481/99, T1881/99, T2191/99
3	ausgeprägte herdförmige Infiltration im Zentrum und in der Peripherie	10	T9335/98, T990/99, T1642/99, T4429/99, T5935/99, T8520/99, T106/00, T391/00, T2639/00, T3838/00
4	Lymphozyten überwiegen gegenüber den Tumorzellen	9	T1442/99, T2058/99, T3739/99, T3901/99, T4296/99, T6641/99, T7435/99, T8032/99, T1190/00

4.3 Histologisches Bild der Histiozytome

Die Histiozytome der **Gruppe 1** wiesen eine Tumorzellinfiltration auf, die von der Epidermis bis an die Subkutis reichte, wobei die Tumorzellen im oberflächlichen Korium dicht gepackt und die Adnexen, bis auf einzelne Residuen von Haarfollikeln, fast vollständig verdrängt waren. In tieferen Schichten waren vermehrt Bündel von kollagenem Bindegewebe vorhanden. Eine Ausnahme stellte der Tumor mit der Tagebuchnummer T 594/00 dar, bei dem im oberflächlichen Korium multifokale Tumorzellherde vorlagen und erst im mittleren Korium dichte Tumorzellareale zu sehen waren. Die Tumoren waren nicht abgekapselt, jedoch gut gegenüber dem umliegenden Gewebe abgrenzbar. Die Tumorzellen zeigten bei allen Histiozytomen die typische Morphologie mit großen, chromatinarmen, rund-ovalen bis bohnenförmigen Kernen und eosinophilem, schlecht abgegrenztem Zytoplasma (Abb. 4). Die Anzahl der Mitosen pro Gesichtsfeld unter Verwendung des 40er-Objektives betrug null bis eine Mitose, lediglich der Tumor T6195/00 wies eine bis zwei Mitosen pro Gesichtsfeld auf. Die Epidermis zeigte bei allen Tumoren eine gering- bis mittelgradige Reteleistenbildung. Bei vier der Histiozytome in Gruppe 1 war die Epidermis nicht ulzeriert, zwei der sechs Tumoren zeigten hingegen eine herdförmige Ulzeration mit serokrystösen Auflagerungen und einer subepidermalen, perivaskulären Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Bereich der Ulzeration (T6646/99, T811/00). In allen untersuchten Proben waren keine Tumorzellen in der Epidermis zu sehen. Alle sechs Tumoren wiesen in der Peripherie eine geringgradige perivaskuläre bis diffuse lymphozytäre Infiltration auf und zwei (T6646/99 und T811/00) zeigten zusätzlich im gesamten Tumorgewebe verteilte vereinzelte Lymphozyten. Der Tumor T594/00 wies im oberflächlichen Korium geringgradige, perivaskuläre Infiltrate mit Lymphozyten auf. Vier der sechs Tumoren wiesen keine Nekroseherde auf, zwei Tumoren zeigten vereinzelt geringgradige, herdförmige Nekrosen mit Kerntrümmern in Randbereichen des Tumorgewebes (T6195/99 und T6646/99) und zwei Tumoren zeigten subepidermale Nekroseherde in Nachbarschaft einer Ulzeration (T6646/99 und T811/00).

In der **Gruppe 2** lag ebenfalls eine gut abgegrenzte Tumorzellinfiltration im Korium vor, die von der Epidermis bis in die Subkutis reichte und im oberflächlichen Korium dichter gepackt war. Auch hier waren die physiologischen Strukturen der Haut weitgehend verdrängt und die Tumorzellen wiesen die typische Morphologie des Histiocytems, wie bei Gruppe 1 beschrieben, auf. Die Anzahl der Mitosen betrug null bis eine, bzw. bei T2191/00 eine bis zwei Mitosen, pro Gesichtsfeld unter Verwendung des 40er-Objektives. Die Epidermis war bei zwei der fünf Tumoren nicht ulzeriert (T2191/00 und T1481/00). Bei einem Tumor lag eine geringgradige herdförmige Ulzeration mit einer geringgradigen subepidermalen gemischtzelligen Entzündungszellinfiltration vor (T3222/99). Zwei Histiocytoeme (T4257/00 und T1881/00) zeigten eine großflächige Ulzeration mit serokrystösen Auflagerungen, Blutungen, und Zelldebris sowie eine hochgradige Infiltration mit neutrophilen Granulozyten in dieser Lokalisation. Alle Tumoren der Gruppe 2 wiesen eine noduläre Infiltration mit Lymphozyten in Randbereichen des Tumors auf sowie eine gering bis mittelgradig ausgeprägte diffuse Infiltration im Zentrum. Bei den zwei stark ulzerierten Histiocytoemen waren im oberflächlichen Korium herdförmige Nekrosen zu sehen, die übrigen Tumoren wiesen, bis auf gelegentliche Einzelzellnekrosen, keine Nekroseherde auf.

Die Histiocytoeme der **Gruppe 3** stellten sich hinsichtlich der Tumorzellmorphologie und -verteilung wie in den Gruppen 1 und 2 dar. Bei fast allen Tumoren betrug die Mitoserate null bis eine Mitose pro Gesichtsfeld (40er-Objektiv), bis auf Tumor T391/00 mit einer bis zwei Mitosen. Die Epidermis war bei drei Tumoren (T9335/98, T1642/99, T391/00) intakt und es waren nur wenige neutrophile Granulozyten in subepidermalen Gefäßen zu erkennen. Vier Tumoren wiesen eine geringgradige Ulzeration (T4429/99, T8520/99, T106/00, T2639/00) mit einer geringgradigen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten auf. Eine großflächige Ulzeration mit serokrystösen Auflagerungen und Zelldetritus lag bei drei Tumoren vor (T990/99, T5935/00, T3838/00) und ging mit einer hochgradigen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten einher, die teils bis in das oberflächliche Korium reichte. Bei allen Tumoren der Gruppe 3 fanden sich herdförmige noduläre lymphozytäre Infiltrate im Tumorgewebe, die besonders prominent am Übergang zur Subkutis waren,

wodurch die Tumorzelldichte im tiefen Korium vermindert erschien. Bei den Histiocyten T1642/99, T8520/99, T106/00, T391/00 sind zudem ausgeprägte noduläre Infiltrate mit Lymphozyten im subkutanen Fettgewebe zu sehen. Multifokale herdförmige Nekrosen in den tieferen Schichten des Tumors waren in vier Tumoren vorhanden (T5935/99, T8520/99, T106/00, T3838/00). Die übrigen Tumoren wiesen nur stellenweise Kerntrümmer oder subepidermal gelegenes nekrotisches Gewebe in Verbindung mit Ulzerationen auf.

Histiocyten der **Gruppe 4** waren insgesamt weniger zellreich und zeigten insbesondere im tiefen Korium einen hohen Anteil an kollagenem Bindegewebe sowie zahlreiche Lymphozyten. Die Makrophagen-ähnlichen Histiocytenzellen bildeten keine größeren Zellverbände, sondern lagen im oberflächlichen Korium gemischt mit lymphozytären Entzündungszellen vor (Abb. 5). Bei vier Tumoren fanden sich keine Mitosen (T3739/99, T4296/99, T7435/99, T1190/00) und bei fünf Tumoren null bis eine Mitose pro Gesichtsfeld (T1442/99, T2058/00, T3901/00, T6641/99, T80317/00). Alle neun Tumoren wiesen in unterschiedlichem Maße eine Ulzeration auf, die bei den Tumoren T1442/99, T3739/99, T6641/99, T7439/99 besonders stark ausgeprägt war und mit einer hochgradigen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und subepidermalen Nekrosen einherging.

Die 4 mm Stanzbiopsien aus dem Inguinalbereich der **Kontrollhunde** waren im HE-Schnitt histologisch ohne besonderen Befund.

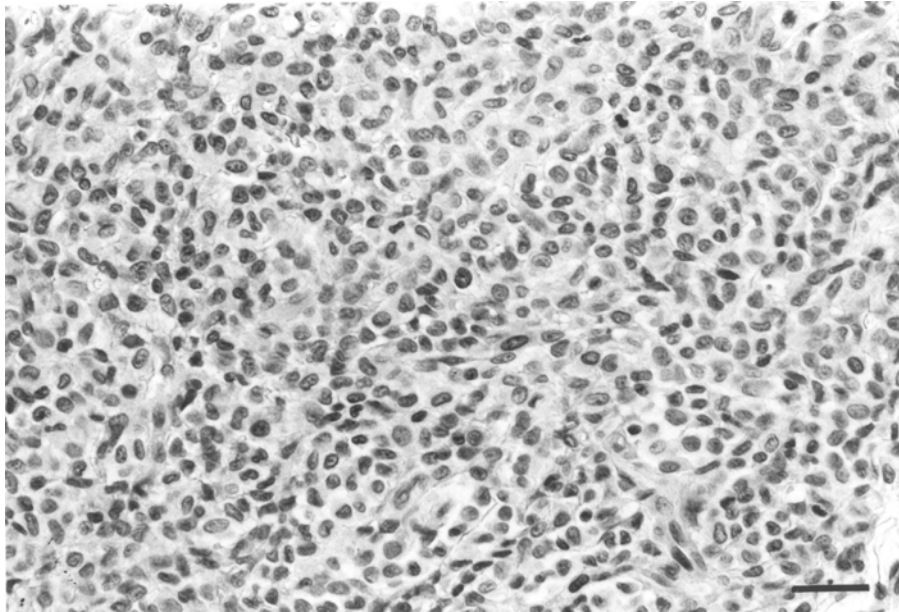


Abb. 4: Histiozytom der Gruppe 1 (T1895/99). Tumorzellen mit rund-ovalen bis bohnenförmige Zellkernen und unscharf begrenztem Zytoplasma; keine lymphozytäre Infiltration im Bildausschnitt zu erkennen. Paraffinschnitt, HE. Die Länge des Balkens entspricht 30 μ m.

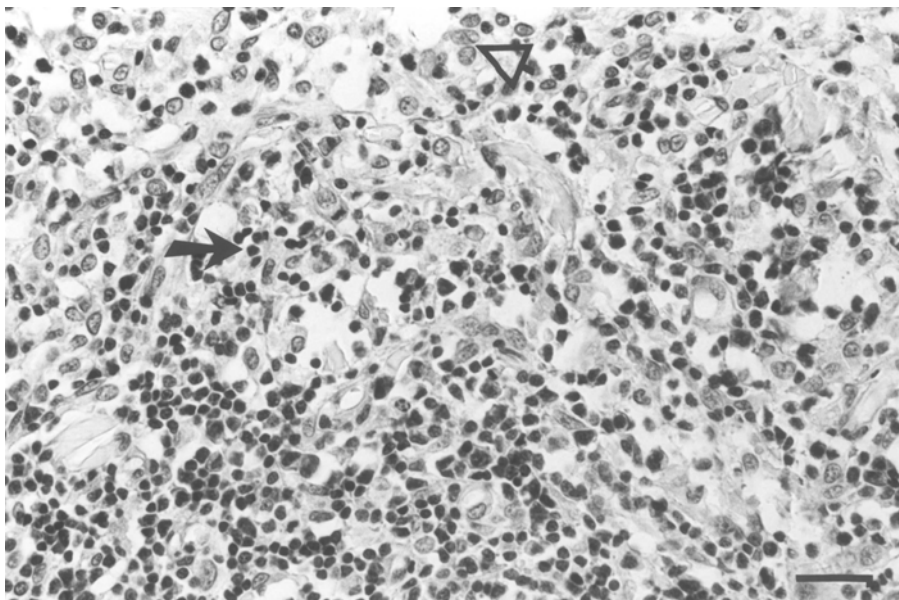


Abb. 5: Histiozytom der Gruppe IV (T2058/99). Infiltration mit zahlreichen reifen Lymphozyten (Pfeil) zwischen den Tumorzellen (Keil). Paraffinschnitt, HE. Die Länge des Balkens entspricht 30 μ m.

4.4 Immunhistologischer Nachweis der Lymphozytendifferenzierungsantigene an Gefrierschnitten

CD3 ϵ -, CD 21(like)-, CD4- und CD8- positive Zellen ließen sich in allen untersuchten Histiozytomen in unterschiedlicher Anzahl nachweisen. Die Immunreaktion gegen diese Lymphozytendifferenzierungsantigene stellte sich als dunkelbraunes, Zellmembran-gebundenes Signal dar.

4.4.1 CD3 ϵ - und CD21(like)-positive Zellen

CD3 ϵ -positive Zellen fanden sich in Gruppe 1 als disseminierte Einzellzellen, die gleichmäßig verteilt zwischen den Tumorzellen lagen. Bei zwei Tumoren (T6195/99 und T6196/99) waren neben positiven Einzelzellen auch kleinere Aggregate CD3 ϵ -positiver Zellen vorhanden. In Gruppe 2 waren ebenfalls CD3 ϵ -positive Zellen zu sehen, die als Einzelzellen oder kleine Zellaggregate innerhalb der Tumorzellverbände lagen. In den Randbereichen der Tumoren fanden sich zudem Herde von dicht aneinander liegenden positiven Zellen, die bei den Tumoren T3222/99 und T2191/00 besonders stark ausgeprägt waren. In Gruppe 3 lagen zahlreiche CD3 ϵ -positive Zellen im gesamten Tumorgewebe diffus verteilt vor. Weiterhin waren große noduläre Ansammlungen von dichten gelagerten positiven Zellen im Zentrum und in der Peripherie des Tumors zu sehen, die bei der Hälfte der Tumoren am Übergang zur Subkutis besonders prominent erschienen (T990/00, T1642/99, T 4429/99, T8520/99, 106/00). In Gruppe 4 lag eine hochgradige diffuse Infiltration mit CD3 ϵ -positiven Zellen in allen Bereichen vor, die Gesamtzellzahl erschien jedoch auf Grund des hohen Bindegewebeanteils gegenüber Gruppe 3 vermindert.

CD21(like)-positive Zellen konnten in den meisten Histiozytomen der Gruppe 1 nicht nachgewiesen werden, lediglich bei den Tumoren T6195/99 und T6646/99 war eine geringgradige fokale perivaskuläre Infiltration zu sehen. In Gruppe 2 zeigte ein Histiozytom (T1481/00) nur wenige CD21(like)-positive Einzelzellen. Die übrigen 4 Tumoren wiesen einige herdförmige Infiltrate in tieferen Schichten des Tumors auf,

außerhalb dieser Herde waren vereinzelt positive Zellen zu sehen. In Gruppe 3 waren herdförmige Infiltrate CD21(like)-positiver Zellen zahlreicher vorhanden und lagen ebenfalls meist an den Randbereichen der Tumoren. In Gruppe 4 fanden sich zahlreiche kleinere Herde von positiven Zellen und disseminierte positive Einzelzellen, die sich nicht auf bestimmte Lokalisationen beschränkten.

Die Quantifizierung der CD3ε- und CD21(like)-positiven Zellen in den Histozytomen ergab, dass in allen 4 Gruppen mehr CD3ε- als CD21-positive Lymphozyten den Tumor infiltrieren (Abb. 6, Abb. 7). Die statistische Auswertung mit anschließendem Gruppenvergleich zeigte, dass die Anzahl der CD3ε- und CD21(like)-positiven Zellen pro mm² im Verlaufe der Tumorregression signifikante Gruppenunterschiede aufweist. Bei den CD3ε-positiven Zellen war ein starker Anstieg des geometrischen Mittelwertes von 76 Zellen pro mm² in Gruppe 1 auf 1369 in Gruppe 2, 1345 in Gruppe 3 und 1071 Zellen pro mm² in Gruppe 4 zu verzeichnen (p-Wert=0,003). Der leichte Abfall in Gruppe 4 erwies sich nicht als signifikant (Abb. 6). Die Mittelwerte der CD21(like)-positiven Zellen zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg von Gruppe 1 mit 7 Zellen pro mm² zu den Gruppen 2, 3 und 4 mit 133, 174 und 221 Zellen pro mm² (p-Wert=0,0027); (Abb. 6).

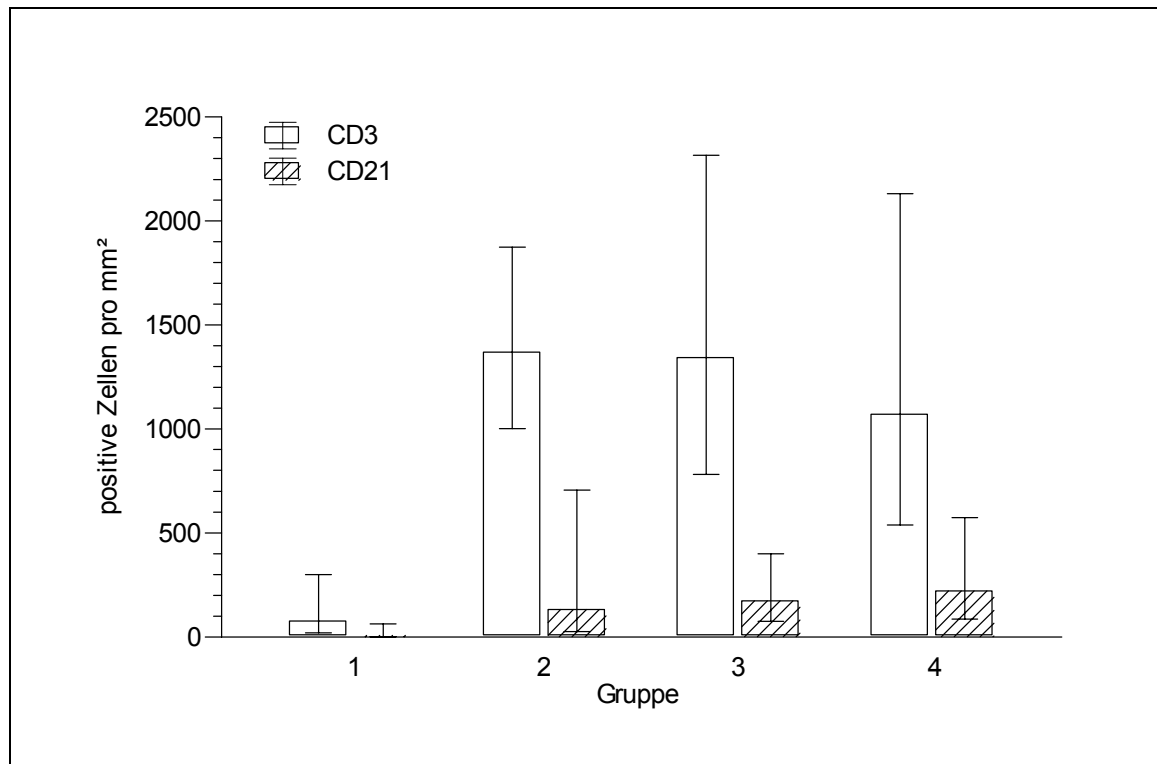


Abb. 6: Anzahl der CD3ε- und CD21(like)-positiven Zellen pro mm² in Histiozytomen der Gruppen 1, 2, 3 und 4. Signifikante Zunahme der CD3ε- ($p=0,003$) und CD21(like)-positiven Zellen ($p=0,0027$) zwischen der Gruppe 1 und den Gruppen 2, 3, und 4. In allen vier Gruppen sind mehr CD3ε- als CD21(like)-positiven Zellen vorhanden. Die Säulen repräsentieren den geometrischen Mittelwert mit Streufaktor.

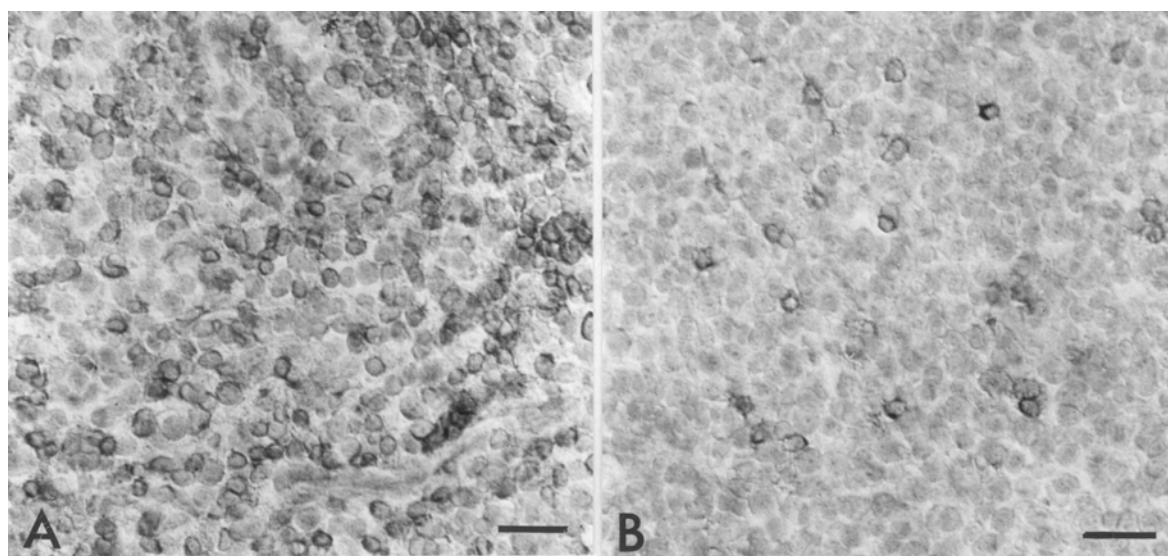


Abb. 7: CD3 ϵ - und CD21(like)-positive Infiltratzellen in einem Histiozytom der Gruppe 2, T2191/00. Gefrierschnitte, ABC-Methode. Die Länge des Balkens entspricht 30 μ m.

- A) zahlreiche CD3 ϵ -positive Zellen
- B) vereinzelte CD21(like)-positive Zellen

4.4.2 CD4- und CD8-positive Zellen

Die CD4-positiven Zellen stellten sich in der Gruppe 1 als weitläufig verteilte Einzelzellen oder gelegentlich als kleine Zellaggregate zwischen den Tumorzellen dar. In der Gruppe 2 waren die CD4-positiven Zellen ebenfalls gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt, jedoch erschienen sie gegenüber Gruppe 1 zahlreicher und bei zwei Histiozytomen lagen zusätzlich herdförmige Ansammlungen positiver Zellen vor (T1481/00 und T2191/00). In der Gruppe 3 fand sich ein ähnliches Bild mit zahlreichen disseminierten CD4-positiven Zellen, bei zwei Histiozytomen traten zusätzlich einzelne noduläre Infiltrate auf (T106/00 und T3838/99). Auch in Gruppe 4 waren zahlreiche, über die gesamten Tumorfläche disseminierte CD4-positive Zellen zu sehen, große noduläre Ansammlungen lagen nicht vor.

CD8-positive Zellen waren in drei der sechs Tumoren in Gruppe 1 als weit verstreute Einzelzellen zu sehen (T1895/99, T594/00, T811/00). Bei zwei Tumoren traten zudem kleine herdförmige Infiltrate an der Grenze des Tumors auf (T6196/99 und T6646/99) und bei einem der sechs Histiozytome waren zahlreiche positive Zellen in den tieferen Schichten des Tumors zu sehen (T6195/99). In Gruppe 2 fanden sich in allen Histiozytomen zahlreiche CD8-positive Zellen, die im oberflächlicheren Bereich eher ein disseminierte Verteilungsmuster aufwiesen und in den Randbereichen des Tumors dichter aneinander lagen. In Gruppe 3 lag eine Infiltration mit zahlreichen CD8-positiven Zellen vor, die am Übergang zum gesunden Gewebe besonders dicht erschien. Bei vier der 10 Tumoren waren zudem besonders prominente noduläre Ansammlungen positiver Zellen am Übergang zum subkutanen Fettgewebe zu sehen (T5935/99, T8520/99, T106/00, T3838/00). In Gruppe 4 fand sich in allen neun Fällen eine hochgradige Infiltration mit CD8-positiven Zellen, die jedoch auf Grund des höheren Bindegewebeanteils der Histiozytome in weniger großen Zellverbänden lagen und die Anzahl etwas niedriger erschien.

Bei der quantitativen Auswertung der Histiozytome zeigten die CD4- und CD8-positiven Zellen einen deutlichen Anstieg von Gruppe 1 zu Gruppe 2, wo hingegen sich die Werte der Gruppen 2, 3 und 4 auf einem ähnlichen Niveau befanden. Bei den CD4-positiven Zellen betrug der geometrische Mittelwert 165 Zellen pro mm^2 in Gruppe 1, hingegen 741, 603 und 918 Zellen pro mm^2 in den Gruppen 2, 3 und 4. Der Mittelwert der CD8-positiven Zellen betrug 96 Zellen pro mm^2 in Gruppe 1 und 1363, 1405 und 1278 Zellen pro mm^2 in den Gruppen 2, 3 und 4. Auch hier erwiesen sich die Gruppenunterschiede mit einem p-Wert von 0,0221 für CD4 und 0,0055 für CD8 bei der Varianzanalyse als statistisch signifikant. (Abb. 8) Der Vergleich des CD4- und CD8-Nachweises innerhalb einer Gruppe zeigte, dass in Gruppe 1, also bei Tumoren, die nur eine minimale lymphozytäre Infiltration aufweisen, mehr CD4- als CD8-positive Zellen vorhanden waren. Sobald hingegen die Infiltration in den Gruppen 2, 3 und 4 zunahm, waren die CD8-positiven Zellen die dominierende T-Zellfraktion (Abb. 8, Abb. 9). Diese Änderung des CD4/CD8-Quotienten erwies sich (p-Wert= 0,002) in der Varianzanalyse als signifikant.

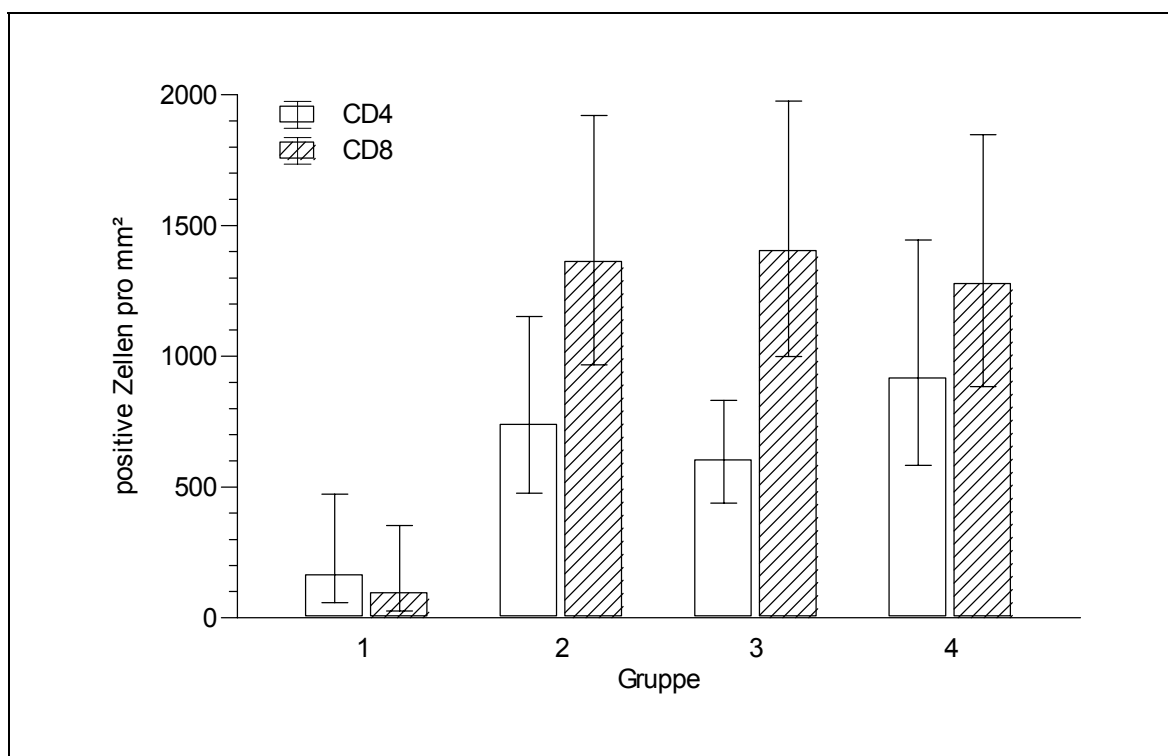


Abb. 8: Anzahl der CD4- und CD8-positiven Zellen pro mm² in Histiozytomen der Gruppen 1, 2, 3 und 4. Signifikante Zunahme der positiven Zellen zwischen der Gruppe 1 und den Gruppen 2, 3, und 4 (CD4: $p=0,0221$, CD8: $p=0,0055$). In den Gruppe 2, 3 und 4 überwiegen die CD8-positiven Zellen. Die Säulen repräsentieren den geometrischen Mittelwert mit Streufaktor.

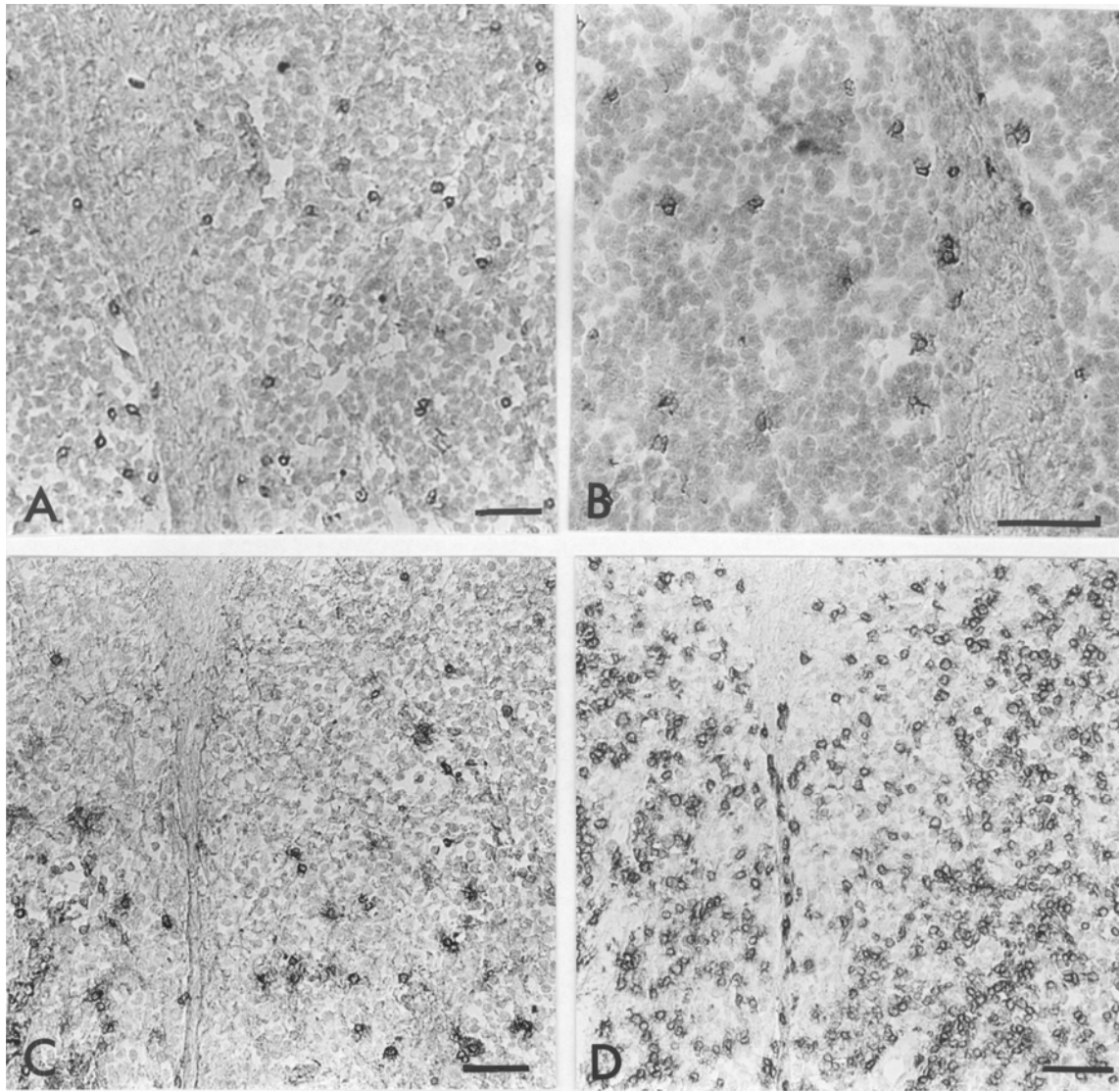


Abb. 9: Immunhistologischer Nachweis der CD4- und CD8- positiven Zellen in Folgeschnitten von Histiocytyomen der Gruppen 1 (T6196/99) und 3 (T1642/99) im Vergleich. In Gruppe 1 sind etwa gleiche Mengen beider Lymphozytenpopulationen vorhanden (A, B), in Gruppe 3 überwiegen die CD8-positiven Zellen (C, D). A) CD4/Gruppe 1; B) CD8/Gruppe 1; C) CD4/Gruppe 3; D) CD8/Gruppe 3. Gefrierschnitte, ABC-Methode. Die Länge des Balkens entspricht 60 µm.

4.4.3 Kontrolltiere

In den als Positivkontrollen verwendeten Milzschnitten eines Hundes waren zahlreiche positive Zellen mit einem membranständigen Signal vorhanden, die bei den Antikörpern gegen CD3 ϵ , CD4 und CD8 besonders prominent im Bereich der periarteriolen Lymphozytenscheide waren und beim CD21(like)-Nachweis Follikel-assoziiert vorlagen. In den Negativkontrollen waren keine positiven Signale vorhanden.

Beim immunhistologischen Nachweis der Lymphozytendifferenzierungsantigene in den Hautbiopsien der Kontrolltiere waren keine oder nur vereinzelte positive Zellen im gesamten Schnitt zu sehen. Die durchschnittliche Anzahl CD3 ϵ - und CD21(like)-positiver Zellen pro mm² lag bei 0,59 (min: 0; max: 1,32) bzw. 0,45 (min: 0; max: 1,79). Der arithmetische Mittelwert der CD4 positiven Zellen betrug 1,74 (min: 0; max: 3,58) und der CD8 positiven Zellen 1,99 (min: 1,15; max: 3,58) pro mm².

4.5 Immunhistologischer Nachweis von Lysozym und myeloischem/histiozytärem Antigen (MAC 387)

Diese beiden Marker für histiozytäre Zellen wurden angewandt, um gegebenenfalls Tumor-infiltrierende Makrophagen von Histiozytomzellen zu unterscheiden und somit das Ausmaß der Infiltration mit Makrophagen in den verschiedenen Regressionsstadien bestimmen zu können. Lysozym wurde jedoch bereits in geringem Ausmaß auch in neoplastische Zellen nachgewiesen. Zudem werden beide Antigene auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert.

4.5.1 Lysozym-positive Zellen

Beim Lysozym-Nachweis war eine eindeutige Abgrenzung von Tumor-infiltrierenden Zellen und Histiozytomzellen schwierig. Bei einigen (n=7) Histiozytomen aus verschiedenen Gruppen konnten Lysozym-positive Zellen mit einem deutlichen,

dunkelbraunen, zytoplasmatischen Signal den übrigen Zellen ohne oder mit einem schwachen granulären zytoplasmatischen Signal gegenüber gestellt werden. In den übrigen Proben (n=23) waren jedoch zahlreiche Abstufungen der Intensität der zytoplasmatischen Reaktion in positiven Zellen zu erkennen, wodurch eine Unterscheidung zwischen negativen oder schwach positiven Tumorzellen und stark positiven infiltrierenden Entzündungszellen nach Stärke der Signals nicht möglich war (Abb. 10 A). Ungeachtet von welcher Zellpopulation die Signale ausgehen, konnte ein signifikanter Anstieg der Lysozym-Immunoreaktivität von Gruppe 1 mit einem geometrischen Mittelwert von 48 positiven Zellen pro mm^2 zu den Gruppe 2, 3 und 4 mit 265, 241 und 204 positiven Zellen pro mm^2 festgestellt werden (p-Wert = 0,003) (Abb. 11).

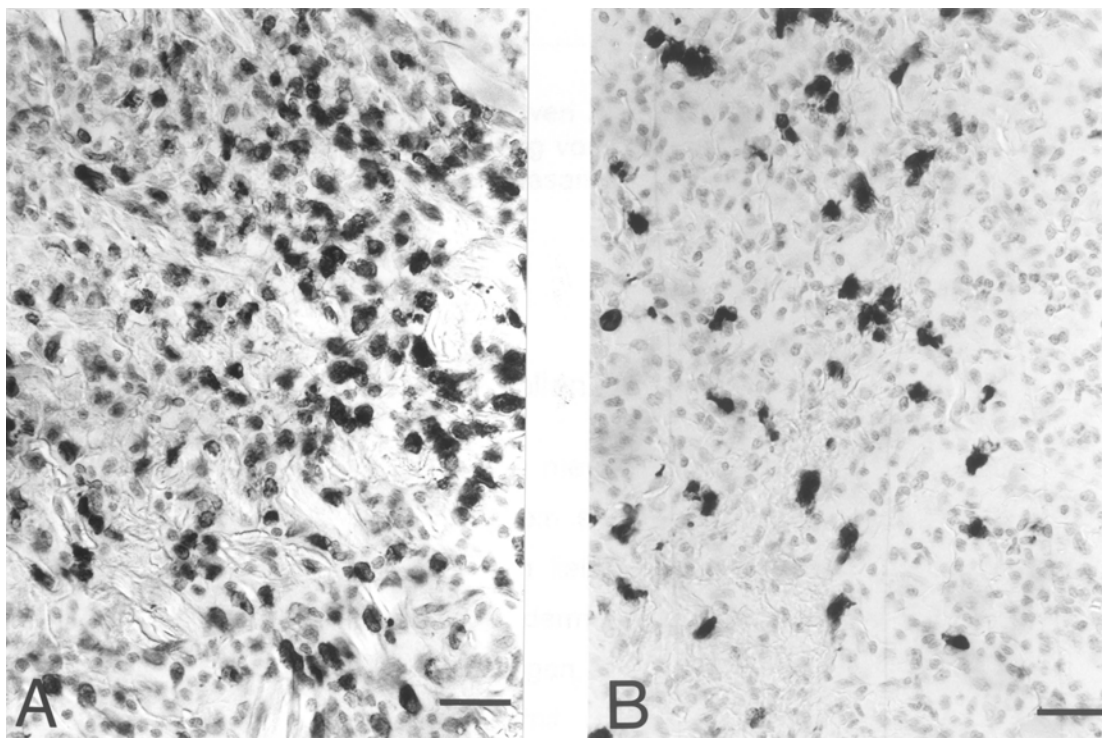


Abb. 10: Gegenüberstellung des immunhistologischen Nachweises von Lysozym und MAC 387 in einem Histiocytom der Gruppe 3 (T5935/99). A: Lysozym-positive Zellen mit verschiedenen Abstufungen der Stärke des Signals. B: MAC 387-positive Zellen mit intensivem Signal neben negativen Tumorzellen. Paraffinschnitt, ABC-Methode. Die Länge des Balkens entspricht 30 μm .

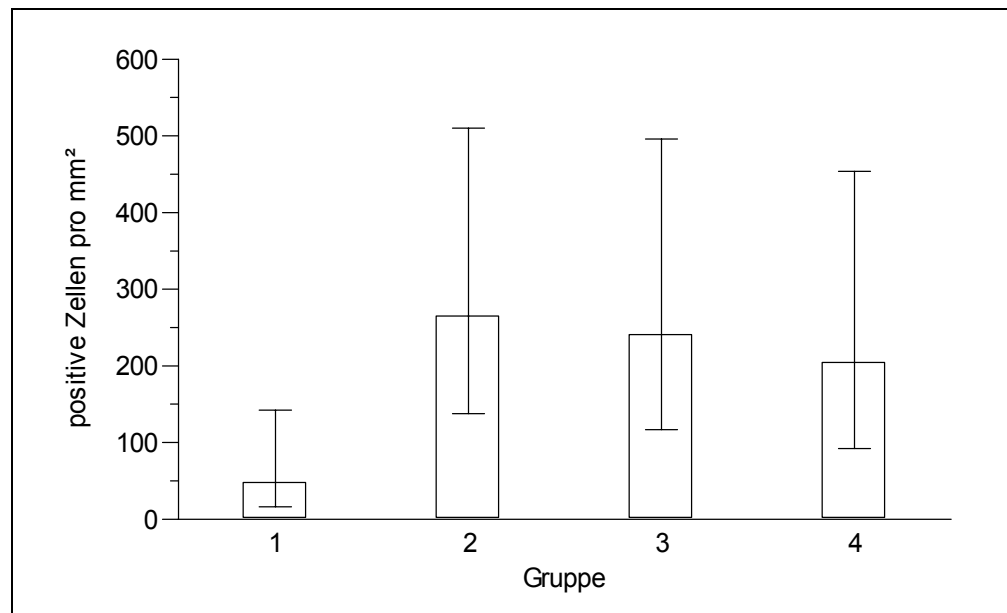


Abb. 11: Anzahl der Lysozym-positiven Zellen pro mm² in den Gruppen 1, 2, 3 und 4. Signifikanter Anstieg von Gruppe 1 zu den Gruppen 2, 3 und 4 ($p=0,003$). Die Säulen repräsentieren den geometrischen Mittelwert und Streufaktor.

4.5.2 MAC 387-positive Zellen

Der immunhistologische Nachweis des myeloischen/histiozytären Antigens (MAC 387) ergab, dass sich Zellen mit einem starken dunkelbraunen Signal von den negativen Histiozytomzellen abgrenzen ließen (Abb.10 B). Diese stark positiven Zellen fanden sich einerseits subepidermal und im oberflächlichen Korium in Assoziation mit ulzerativen Veränderungen, also entsprechend den Lokalisationen, die im HE-Schnitt eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten aufwiesen. Weiterhin fanden sich positive Einzelzellen oder Aggregate dieser Zellen in mittleren und tiefen Schichten des Tumorgewebes. In diesen Bereichen waren im HE-Schnitt keine neutrophilen Granulozyten nachweisbar, sondern lediglich histiozytäre oder lymphatische Zellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich in diesen Lokalisationen bei stark MAC 387-positiven Zellen um Tumor-infiltrierende

Makrophagen handelt. In der Gruppe 1 fanden sich insgesamt wenig MAC 387 positive Zellen, die weit verstreut zwischen negativen Tumorzellen lagen (Abb.12 A). Bei zwei von sechs Histiozytomen lagen zahlreiche MAC 387-positiven Zellen in Epidermisnähe vor (T6195/99 und T6646/99). Sonst lagen die disseminierten positiven Zellen relativ gleichmäßig verteilt vor und fanden sich auch in den tieferen Schichten des Tumors. Nur bei einem Histiozytom dieser Gruppe (T6195/00) beschränkten sich die positiven Zellen auf das oberflächliche Korium. In Gruppe 2 zeigten zwei der fünf Histiozytome (T4257/99, T1881/00) zahlreiche MAC 387-positive Zellen und herdförmige Infiltrate in Verbindung mit einer Ulzeration. Die übrigen drei Histiozytome zeigten zahlreiche gleichmäßig verstreute MAC 387-positive Zellen (Abb.12 B). In Gruppe 3 lagen bei fünf von zehn Histiozytomen größere Herde von positiven Zellen in der Nähe der Epidermis bzw. in direkter Verbindung mit einer Ulzeration vor (T990/99, T4429/99, T5935/99, T391/00, T3838/00). In den restlichen Histiozytomen waren die positiven Zellen in tieferen Schichten des Tumors herdförmig oder als disseminierte Einzelzellen verteilt. Auch in Gruppe 4 lagen bei fünf der neun Histiozytome die MAC 387-positiven Zellen gehäuft an der Tumoroberfläche vor, bei den übrigen 4 Tumoren waren die positiven Zellen in dieser Lokalisationen nicht besonders zahlreich vorhanden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit zunehmender Gruppennummer ein erhöhter Prozentsatz an Histiozytomen mit ausgeprägten Infiltraten von MAC 387-positiven Zellen in Epidermisnähe kommt, also mit Zellen bei denen es sich wahrscheinlich um neutrophile Granulozyten handelt. Die quantitative Auswertung, unabhängig von der Lokalisation, ergab, dass die Anzahl der MAC 387-positiven Zellen einen signifikanten Anstieg (p -Wert= 0,0016) von Gruppe 1 mit einem geometrischen Mittelwert von 15 positiven Zellen pro mm^2 zur Gruppe 2 mit 83 positiven Zellen pro mm^2 erfährt. Die Mittelwerte der Gruppen 3 und 4 betrugen 93 und 82 positive Zellen pro mm^2 (Abb. 13).

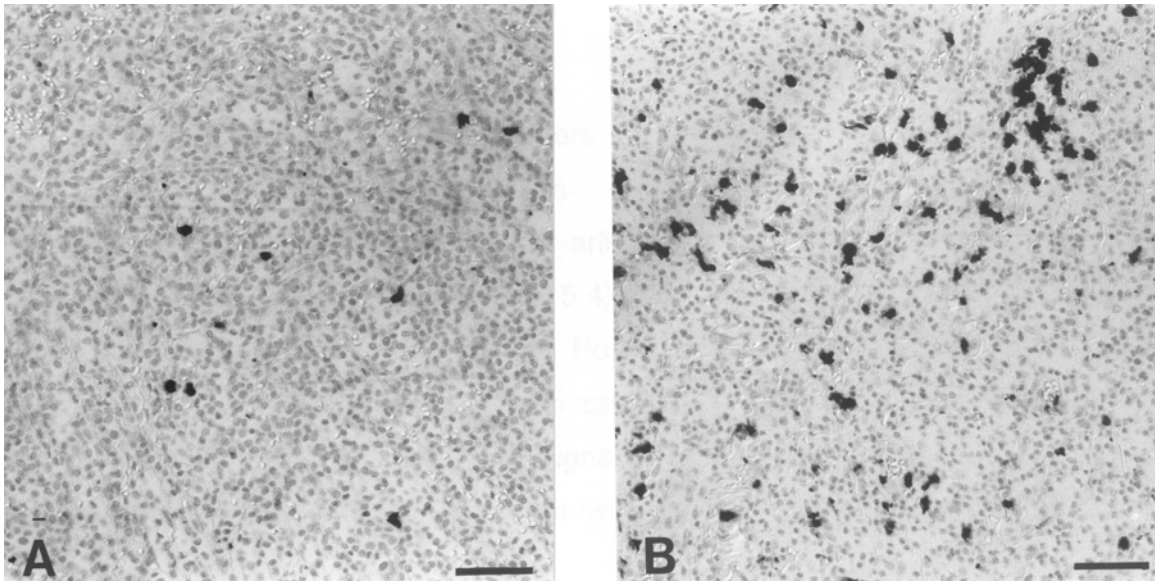


Abb.12: Immunhistologischer Nachweis von MAC 387 in einem Histiocyтом der Gruppe 1 (T1895/99) mit geringer Anzahl positiver Zellen (A) und Gruppe 2 (T4257/99) mit zahlreichen positiven Zellen (B). Paraffinschnitte, ABC-Methode. Die Länge des Balkens entspricht 60 μm .

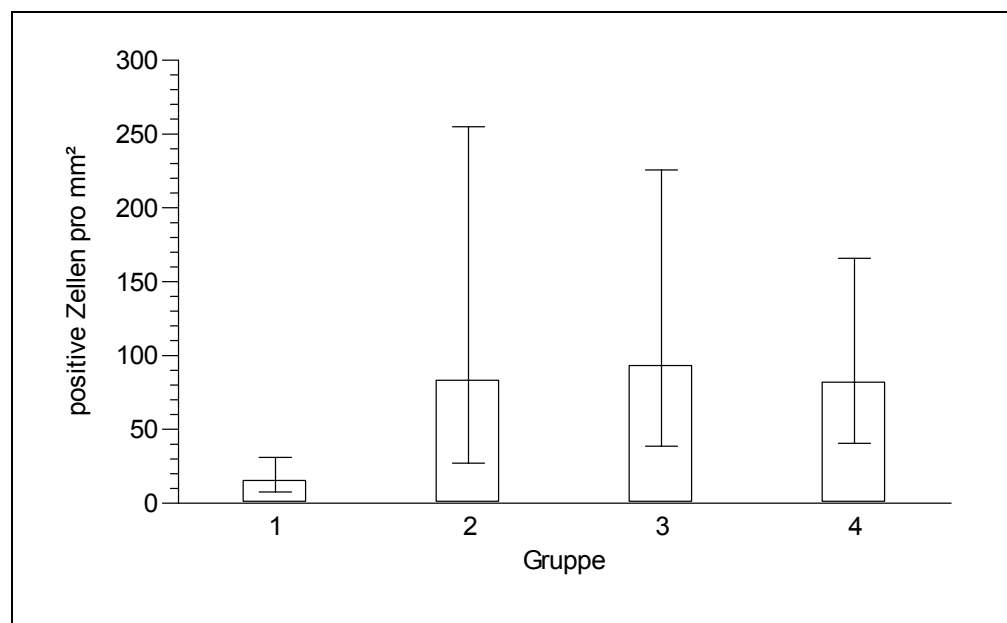


Abb. 13: Anzahl der MAC 387-positiven Zellen in den Gruppen 1, 2, 3 und 4. Signifikanter Anstieg zwischen der Gruppe 1 und den Gruppen 2, 3 und 4 ($p=0,0016$). Die Säulen repräsentieren den geometrischen Mittelwert und Streufaktor.

4.5.3 Kontrolltiere

In den Hautbiopsien der Kontrolltiere waren nur vereinzelt geringgradige perivaskuläre Infiltrate von Lysozym- oder MAC 389-positiven Zellen im oberflächlichen Korium vorhanden. Der arithmetische Mittelwert der Kontrollgruppe betrug bei Lysozym 3,01 (min: 1; max: 5,4) und bei MAC 387 4,49 (min: 3,4; max: 5,04) positive Zellen pro mm². Die als Positivkontrolle eingesetzte granulomatöse Entzündung wies bei beiden Antikörpern zahlreiche positive Zellen auf, die bei MAC 387 ein homogenes dunkelbraunes Signal und bei Lysozym ein etwas helleres granuläres zytoplasmatisches Signal aufwiesen. In den Negativkontrollen fanden sich keine spezifischen Signale.

4.6 Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode

Mit der TUNEL-Methode ließen sich in den Tumoren aller vier Gruppen positive Zellen nachweisen. Ein nukleäres Signal fand sich in Zellen, die einen kondensierten, dunklen Kern mit umgebendem Halo zeigten, aber auch häufig in Zellkernen, die morphologisch intakt erschienen. Weiterhin fanden sich morphologisch intakte Zellen, die eine zytoplasmatische Reaktion zeigten. Zudem waren zellfreie, angefärbte Fragmente zu erkennen und Zelldebris, wie er vor allem oberflächlich bei ulzerierten Tumoren vorlag, ließ sich anfärben. Die positiven Zellen ließen sich in keiner der 4 Gruppen einer bestimmtem Lokalisation zuordnen, sondern fanden sich meist als disseminierte Einzelzellen im Tumor. Bei Tumoren mit auffälligen Ulzerationen und Nekrosen war der Anteil an positiv reagierendem strukturlosem Material erhöht. Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in Relation zur gesamten Zellzahl eines Zählfeldes betrug 1,2% in Gruppe 1, 0,9% in Gruppe 2, 1,4% in Gruppe 3 und 1% in Gruppe 4. Beim statistischen Gruppenvergleich der Histiozytome ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen (p-Wert=0,6076); (Abb.14). Ebenso ergab der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven Zellen, die zusätzlich morphologische Merkmale der Apoptose aufwiesen, im

Verhältnis zur Gesamtzellzahl keine relevanten Unterschiede zwischen den Histozytomen in verschiedenen Stadien der Regression (p -Wert=0,2031). In den Hautbiopsien der Kontrolltiere konnten bis auf vereinzelte TUNEL-positive Keratinozyten keine positiven Zellen nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle, ein Rektumpolyp vom Schäferhund (T9743/99) zeigte ein Signal in den Zellen mit kondensiertem Chromatin aber auch zahlreiche rot gefärbte Zellkerne, die morphologisch intakt erscheinen. In den Negativkontrollen waren keine TUNEL-positiven Zellen nachweisbar.

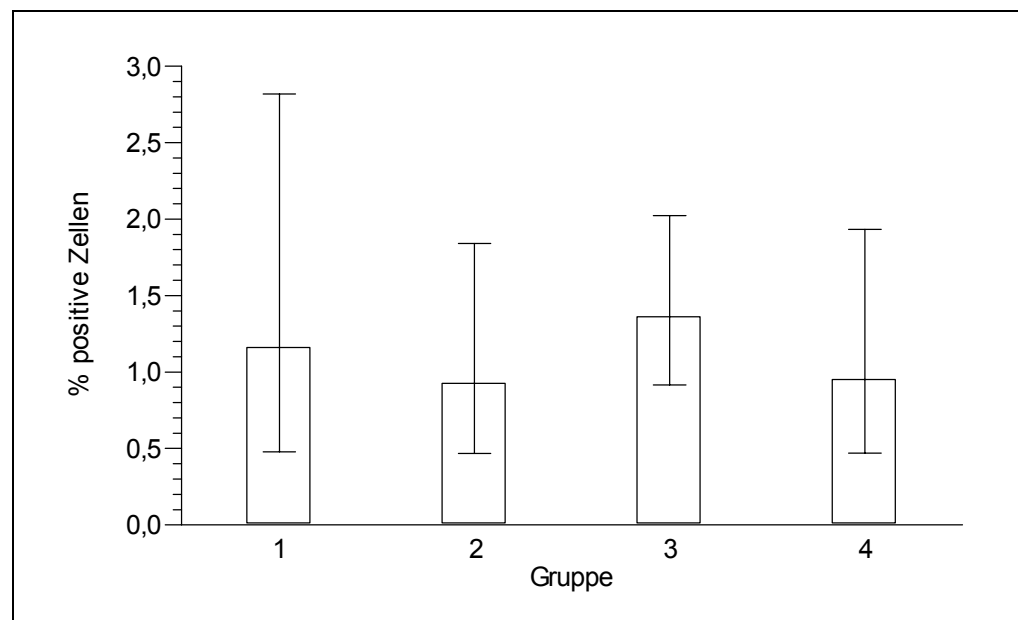


Abb.14: Prozentualer Anteil der TUNEL-positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl. Es konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden ($p=0,6076$). Die Säulen repräsentieren den geometrischen Mittelwert und Streufaktor.

4.7 Nachweis der Zytokin und iNOS mRNA-Expression

Die Expression verschiedener Zytokine, des „housekeeping gens“ Aktin sowie der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) wurde in 30 Histiozytomen (Gruppen 1-4) und in 4 Hautbiopsien gesunder Beagles untersucht. Um neben der Schmelzkurve des LightCycler eine weitere Darstellung der PCR-Produkte zu erhalten, wurden die Amplifikate der positiven Standardreihen auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Kontrollen, Concanavalin A-stimulierte Lymphozyten bzw. eine Leishmaniose-bedingte granulomatöse Dermatitis für den iNOS-Nachweis, ergaben bei allen Primerpaaren Gel-Banden in der erwarteten Basenpaarlänge und einheitliche Gipfel-förmige Kurven in der Schmelzkurvenanalyse des LightCycler. Die Amplifikat-Längen bzw. der Schmelzkurvenverlauf der Histiozytome und der Kontrollhaut stimmten mit denen der Positivkontrollen überein. Bei keinem der PCR-Läufe waren Amplifikate in den Negativkontrollen vorhanden. Die Elektrophoretische Auftrennung der positiven Verdünnungsreihen ist in Abbildung 15 zu sehen. Zur genauen Identifizierung der PCR-Produkte wurden die verschiedenen Amplifikate eines Histiozytoms (T8520/00) unaufgereinigt zur Ansequenzierung eingesandt und die Ergebnisse mit publizierten DNA-Sequenzen verglichen (BLAST database: Gene Bank+ EMBL+ DDBJ+PDB sequenzen). Das Ergebnisse für die PCR Produkte von IL-1 (p69/p70), IL-8 (p29/p30) und IL-10 (p51/p32) entsprachen zu 100% den entsprechenden Sequenzen (Z70047, D28772, AF328930). Die Amplifikate von IL-12 (p77/p88), IFN- γ (p73/p36), TNF- α (p23/p24) und TGF- β (p45/p46) wiesen eine Homologie von 99% mit publizierten kaninen Sequenzen auf (U49100, S41201, Z70046, L34956). Bei IL-2 (p71/p44) fand sich eine Übereinstimmung von 98%, bei iNOS (p127/p95) von 97%, bei GAPDH (p42/p43) von 95% und bei Aktin (p7/p8) von 88% (U28141, AF032909, AF327898, AF021873). Die Aktin mRNA-Expression wurde als Referenzwert jeder Einzelprobe eingesetzt, zu dem die übrigen mRNA Werte in Relation gesetzt wurden. Bei der Auswahl dieses sogenannten „housekeeping gens“ sollte berücksichtigt werden, dass es keine spezifischen Auf- oder Abregulation im Verlaufe der Tumorregression erfährt. Die Berechnung mit Hilfe der Spearman Rangkorrelation ergab für das „housekeeping“ Gen Aktin keinen signifikanten Trend (p-Wert=0,0556)

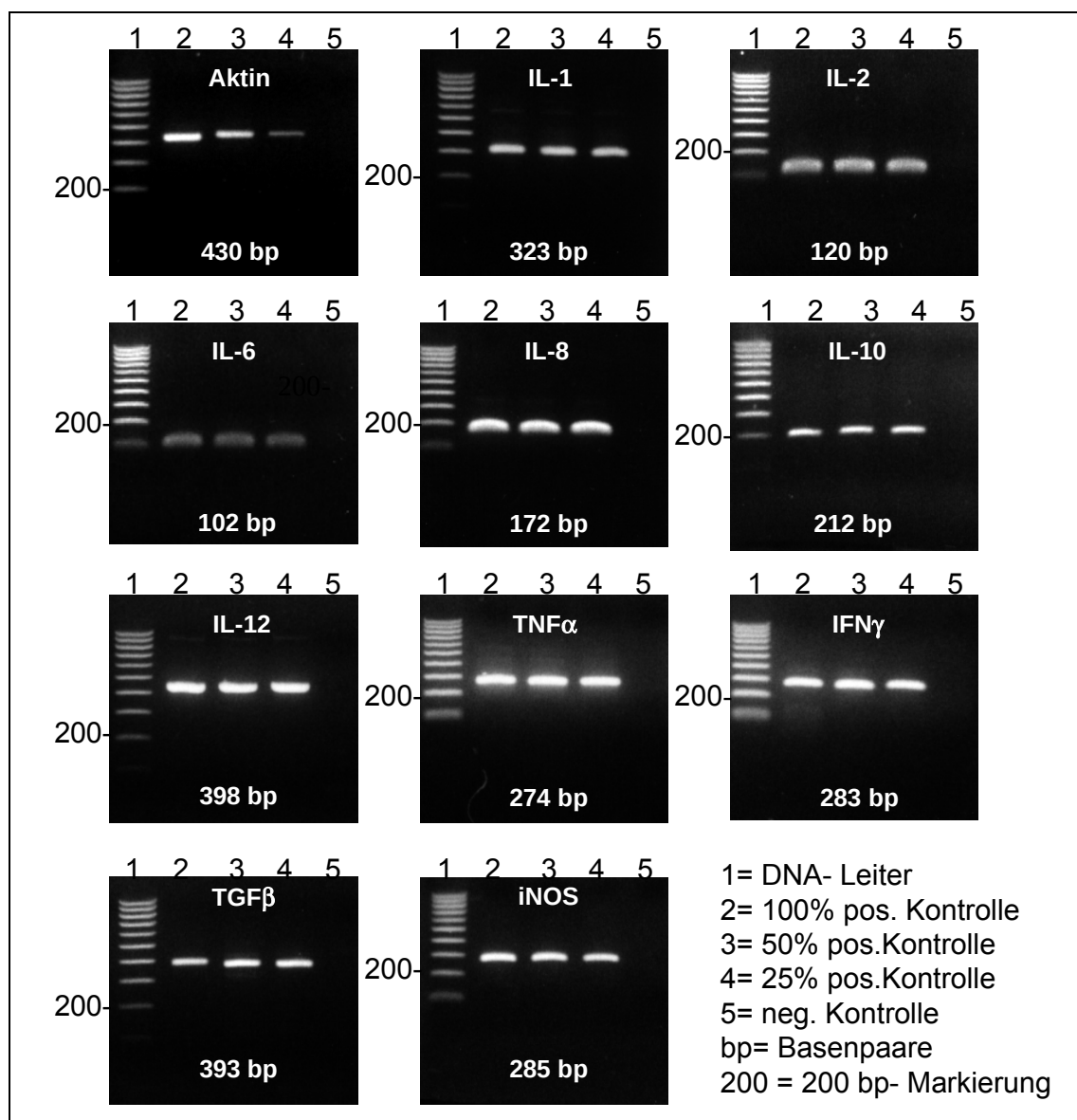


Abb. 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus cDNA-Verdünnungsreihen von ConA-stimulierte Lymphozyten, die als Positivkontrolle verwendet wurden.

4.7.1 Histiozytome

IL-1 mRNA konnte in 40% der Histiozytomen der Gruppen 2, 30% der Gruppe 3 und in 56% der Gruppe 4 nachgewiesen werden (Abb. 16). Alle Tumoren der Gruppe 1 waren negativ für IL-1. Bei der statistischen Auswertung der relativen IL-1 Werte in Bezug zum housekeeping Gen Aktin, lag der Median jeder Gruppe bei 0% und es konnten keine Gruppenunterschiede festgestellt werden (p-Wert=0,204); (Abb. 17).

IL-6 mRNA konnte in allen 30 Histiozytomen nachgewiesen werden (Abb. 16). Beim Gruppenvergleich der semiquantitativen Werte in Bezug zu Aktin waren die Mediane der Gruppen 2 und 3 mit 75,8% und 64,5% um mehr als die Hälften kleiner als der Median der Gruppe 1 mit 188%. In Gruppe 4 kam es wieder zu einem Anstieg des Medians auf 116,2%. Diese Gruppenunterschiede erwiesen sich jedoch nicht als signifikant (p-Wert=0,089); (Abb. 17).

Alle untersuchten Histiozytome waren positiv für **IL-8** (Abb. 16). Die semiquantitativen Werte in Relation zur Aktin-Expression lagen bei 18,2% in Gruppe 1, 13,8% in Gruppe 2, 11,6% in Gruppe 3 und 18,1% in Gruppe 4. Somit befand sich die Expression in den 4 Gruppen auf einem ähnlichen Niveau und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert=0,335); (Abb. 17).

IL-2 mRNA wurde lediglich in 17% der Tumoren in Gruppe 1 nachgewiesen. In Gruppe 2 waren 80%, in Gruppe 3 90% und in Gruppe 4 89% der Proben positiv für IL-2 mRNA (Abb. 16). Bei der statistischen Auswertung der semiquantitativen Ergebnisse bestand ein signifikanter Gruppenunterschied (p-Wert=0,0264) mit einem etwa 40- bis 50-fachen Anstieg der Mediane in den Gruppen 2, 3 und 4 (51,6%, 43,6% und 42%) gegenüber dem Median der Gruppe 1 (1%); (Abb. 18).

In Gruppe 1 war eines von sechs Histiozytomen schwach positiv für **IL-12** (17%), in Gruppe 2 konnte in keinem (0%) der Tumoren IL-12 mRNA nachgewiesen werden. In Gruppe 3 waren 40% und in Gruppe 4 56% der Histiozytome positiv (Abb. 16). Bei der Betrachtung der semiquantitativen Werte im Verhältnis zur Aktin-Expression lagen die Mediane der ersten 3 Gruppen bei 0% und in Gruppe 4 bei 33,7%. Obwohl

es sich augenscheinlich um einen Anstieg der IL-12 Expression handelte, ergab der statistische Gruppenvergleich der semiquantitativen Ergebnisse keine signifikanten Änderungen (p-Wert=0,134); (Abb. 18).

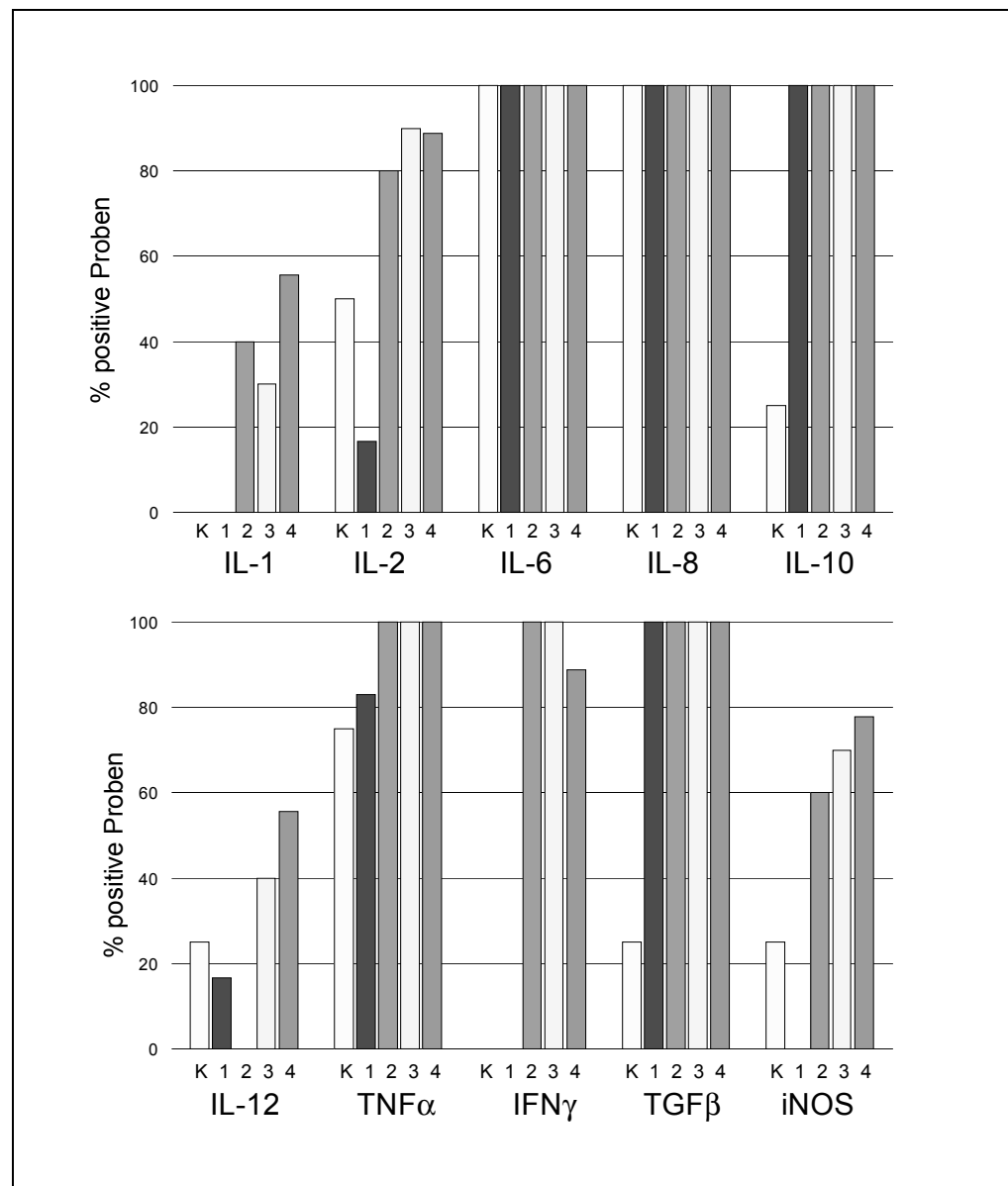
TNF α wurde in 83% der Proben in Gruppe 1 und in 100% der Proben in den Gruppen 2, 3 und 4 nachgewiesen (Abb. 16). Der Median der semiquantitativen Werte war in Gruppe 1 mit 0,4% deutlich kleiner als in den übrigen drei Gruppen (4,8%, 5% und 6,5%). Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Gruppenunterschied (p-Wert=0,0033), der im paarweisen Vergleich im Besonderen zwischen der Gruppe 1 und den Gruppen 3 und 4 lag (Abb. 18).

Sämtliche Proben der Gruppe 1 waren negativ für **IFN γ** . In den Histiozytomen der Gruppen 2 und 3 hingegen konnte zu 100% und in Gruppe 4 zu 89% IFN γ RNA nachgewiesen werden (Abb. 16). Diese Varianz innerhalb der Gruppen äußerte sich auch bei der semiquantitativen Auswertung in einem starken Anstieg des Medians von 0% in Gruppe 1 auf 66,4%, 55,4% und 46,9% in den Gruppen 2, 3 und 4 und erwies sich mit einem p-Wert von 0,003 als signifikant (Abb. 18).

TGF β und **IL-10** mRNA konnte in allen Histiozytomen nachgewiesen werden (Abb. 16), bei der Auswertung der semiquantitativen Ergebnisse ergaben sich jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede (TGF β : p-Wert=0,522, IL-10: p-Wert=0,122). Die Mediane der relativen Werte in den Gruppen 1, 2, 3 und 4 betrugen 112,7%, 143,9%, 130% und 73% für IL-10; bzw. 205,3%, 119%, 129,4% und 117,1% für TGF β ; (Abb. 19).

In Gruppe 1 war keine der Proben positiv für **iNOS**, in den Gruppen 2, 3, und 4 konnte in 60%, 70% und 78% der Proben iNOS mRNA nachgewiesen werden (Abb. 16). Dieser qualitative Gruppenunterschied spiegelte sich auch bei den semiquantitativen Ergebnissen in einem Anstieg des Medians von 0% in Gruppe 1 auf 25%, 19,6% und 24,9% in den folgenden Gruppen wieder und erwies sich in der statistischen Auswertung als signifikant (p-Wert= 0,0454); (Abb. 20).

In Abbildung 16 werden die qualitativen PCR-Ergebnisse als prozentualer Anteil der positiven Proben in den einzelnen Gruppen wiedergegeben. In den Abbildungen 17 bis 20 sind die Ergebnisse der semiquantitativen Echtzeit PCR als % der Aktin-Expression angegeben.



K=Kontrollgruppe, 1=Gruppe 1, 2=Gruppe 2, 3=Gruppe 3, 4=Gruppe 4

Abb. 16: Qualitative PCR-Ergebnisse der Kontrollgruppe (K) und der Histozytomgruppen (1-4). Prozentualer Anteil der Zytokin bzw. iNOS mRNA-positiven Proben in den einzelnen Gruppen.

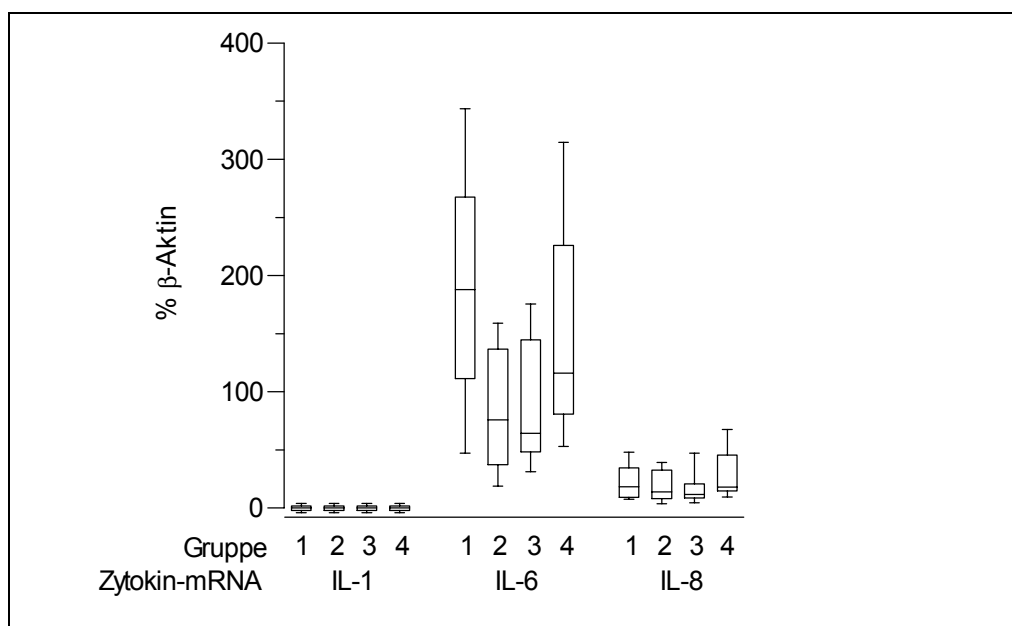


Abb.17: Relative mRNA-Werte als % der Aktin-Expression. IL-1, IL-6 und IL-8 zeigen keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede. Box und Whisker Plots stellen Median, Minimum und Maximum sowie oberes (Q3) und unteres Quartil (Q1) dar.

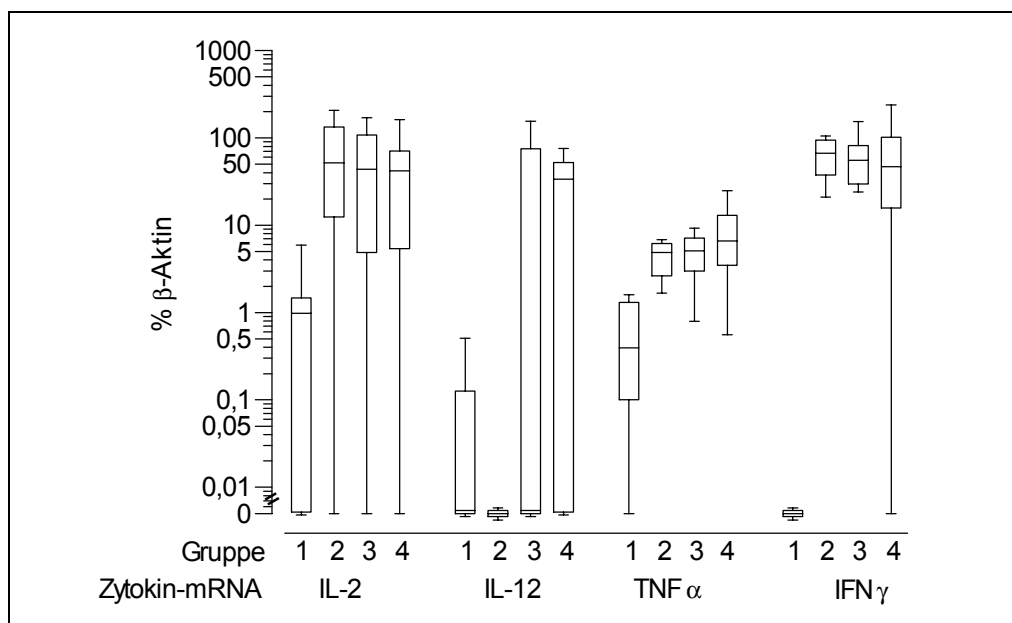


Abb.18: Relative mRNA-Werte inflammatorischer Zytokine als % der Aktin-Expression. Signifikante Gruppenunterschiede bei IL-2 ($p=0,0264$), $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,0017$) und $\text{IFN}\gamma$ ($p=0,003$). Box und Whisker Plots stellen Median, Minimum und Maximum sowie oberes (Q3) und unteres Quartil (Q1) dar

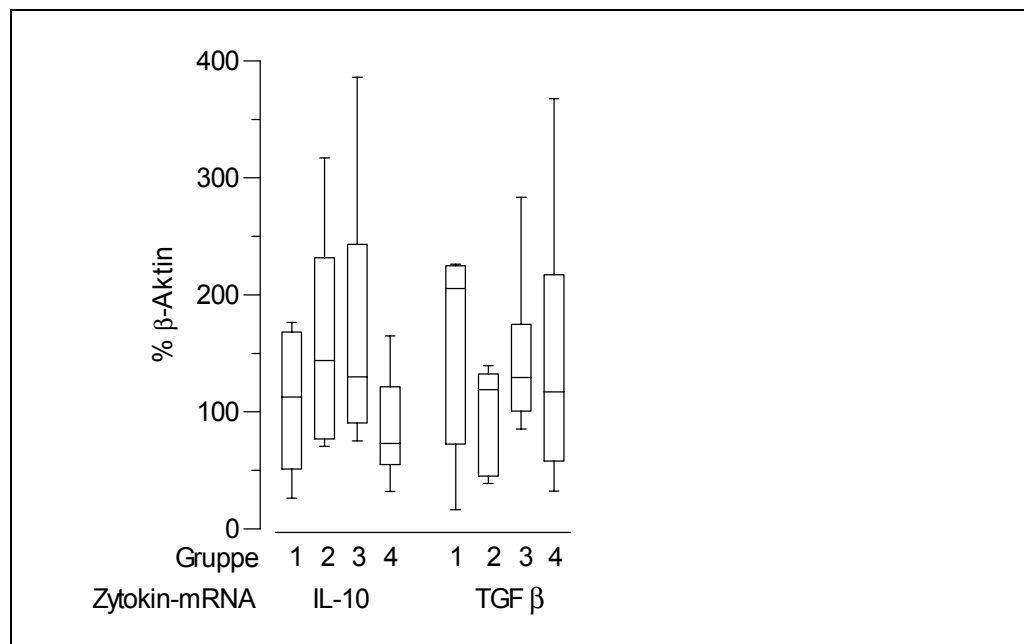


Abb.19: Relative mRNA-Werte anti-inflammatorischer Zytokine als % der Aktin-Expression. IL-10 und TGFβ zeigen keine signifikanten Gruppenunterschiede. Box und Whisker Plots stellen Median, Minimum und Maximum sowie oberes (Q3) und unteres Quartil (Q1) dar.

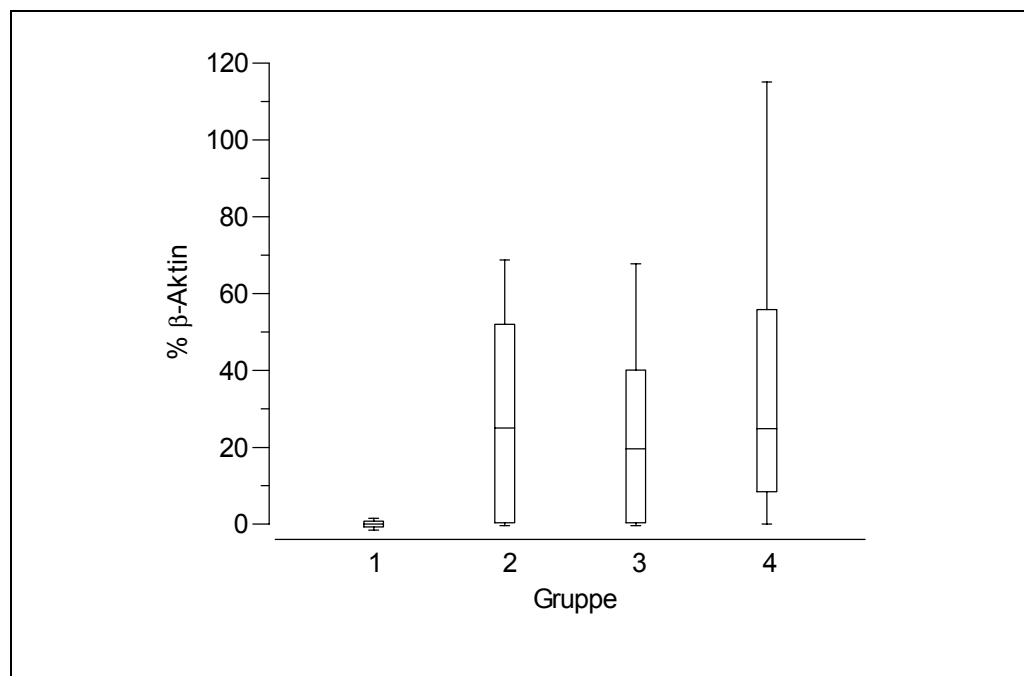


Abb. 20: Relative iNOS mRNA-Werte als % der Aktin-Expression. Signifikanter Anstieg der iNOS mRNA ($p=0,045$) Box und Whisker Plots stellen Median, Minimum und Maximum sowie oberes (Q3) und unteres Quartil (Q1) dar.

4.7.2 Kontrolltiere

Die Ausbeute bei der RNA Isolierung und die mRNA Expression des housekeeping gens in den Hautbiopsien der Kontrolltiere war im Verhältnis zum zellreichen neoplastischen Gewebe der 4 Tumorguppen sehr gering. Wegen des unterschiedlichen Ausgangsmaterial wurden die Werte nicht in den statistischen Gruppenvergleich der Tumorregressionstadien aufgenommen und lediglich qualitativ ausgewertet. IL-1 und IFN γ RNA konnte in keiner der Hautbiopsien nachgewiesen werden. Eines der vier Kontrolltiere war positiv für IL-10, IL-12, TGF β und iNOS (25%). In zwei Proben war IL-2 nachweisbar (50%) und drei der vier Hunde waren schwach positiv für TNF α (75%). IL-6 und IL-8 mRNA konnte in allen vier Hautproben nachgewiesen werden (Abb. 16).

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Immunreaktion bei der Regression des kaninen kutanen Histiozytoms näher zu beschreiben. Dazu wurden 30 Histiozytome nach dem Ausmaß ihrer regressiven Veränderungen in 4 Gruppen unterteilt. Zunächst wurde eine Charakterisierung und Quantifizierung der infiltrierenden Entzündungszellen in den einzelnen Gruppen vorgenommen und die Anzahl der apoptotischen Zellen bestimmt. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die mRNA-Expression ausgewählter Zytokine sowie der induzierbaren NO-Synthase in den verschiedenen Stadien der Regression untersucht.

30 Patienten, deren Tumoren in dieser Arbeit untersucht wurden, entsprachen hinsichtlich der Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung den Beschreibungen in der Literatur (TAYLOR et al. 1969; FRESE et al. 1989; KIPAR 1994). Die Histiozytome betrafen hauptsächlich junge Hunde und traten nur vereinzelt bei älteren Tieren auf. Eine Geschlechtsdisposition war nicht festzustellen. Viele Hunde gehörten zu den Retriever- oder Terrierrassen und deren Mischlingen. Daraus läßt sich jedoch keine Disposition ableiten, da es sich um populäre Hunderassen handelt. Auch Boxer und Doggen waren relativ häufig betroffen.

Hinsichtlich der Tumorlokalisation und -größe fand sich ebenfalls eine Übereinstimmung mit den Literaturangaben (TAYLOR et al. 1969; FRESE et al. 1989; KIPAR 1994). Die Mehrzahl der Histiozytome befanden sich an den Gliedmaßen oder am Kopf der Tiere und die Größe lag zwischen 0,4-1,4 cm. Eine gezielte epidemiologische Untersuchung hinsichtlich der genannten Merkmale ist auf Grund der geringen Fallzahl nicht möglich und war nicht das Ziel dieser Untersuchung. Bei den meisten Histiozytome fanden sich zum Zeitpunkt der Entnahme bereits deutliche regressive Veränderungen. Zahlreiche Tumoren waren ulzeriert und zeigten eine oberflächliche eitrige Entzündung. Wahrscheinlich bemerkten viele Hundebesitzer den Tumor relativ spät und entschieden sich erst zu einer operativen Entfernung, als bereits sekundäre Veränderungen vorlagen. Zeitangaben zum erstmaligen Wahrnehmen der Histiozytome lagen leider nicht vor. Durch die Schwierigkeit, Histiozytome ohne regressive Veränderungen zu erhalten,

kam es zu einer ungleichen Verteilung der Fallzahlen in den einzelnen Gruppen mit fast doppelt so viel Tumoren in den Gruppen 3 und 4 gegenüber den den beiden ersten Gruppen.

Bei der in Anlehnung an COCKERELL und SLAUSON (1979) vorgenommenen Gruppeneinteilung gestaltete sich die Zuordnung der Tumoren in den Gruppen mit ausgeprägten lymphozytären Infiltraten schwierig, da die Übergänge zwischen den Gruppen 2 und 3 sowie 3 und 4 fließend waren. Dabei ist auch zu bedenken, dass nur eine Schnittebene beurteilt wurde und sich das Bild eines nodulären Infiltrates in benachbarten Ebenen unterschiedlich darstellen kann. Die unscharfe Abgrenzung dieser 3 Gruppen voneinander spiegelt sich auch in den Untersuchungsergebnissen wider, da bei der Beurteilung verschiedener Parameter im Gruppenvergleich signifikante Unterschiede stets zwischen der Gruppe 1 und den übrigen 3 Gruppen lagen.

Die Charakterisierung der infiltrierenden Entzündungszellen, der Nachweis apoptotischer Zellen und die Untersuchung der Zytokin bzw. iNOS mRNA-Expression wurde ebenfalls an Hautbiopsien aus dem Inguinalbereich von gesunden Beagles als Kontrollhunde vorgenommen. Allerdings erschien es bei der statistischen Auswertung nicht sinnvoll, die Daten dieser Untersuchungen in den Gruppenvergleich der Histiozytome einzubeziehen. Die Ausgangsmaterialien waren kaum zu vergleichen, da es sich zum einen um relativ kollagenfaserreiches Gewebe mit den komplexen Strukturen der Haut und andererseits um eine zellreiche homogene Neoplasie handelt, die stark proliferiert und die ursprüngliche Architektur der Haut verdrängt hat. In gewissem Maße stellten in dieser Arbeit die Histiozytome der Gruppe 1, bei denen kaum entzündliche Alterationen vorlagen, die Bezugsgröße dar, denen die Werte der Histiozytome mit unterschiedlich stark ausgeprägten regressiven Veränderungen gegenübergestellt wurden. Trotzdem ist es für das Verständnis der Immunpathologie der Haut notwendig zu wissen, welche Zellzahlen physiologischerweise vorliegen und welche Zytokine normalerweise in der Haut exprimiert werden. Um dazu einen ersten Einblick zu gewinnen, wurden die 4 Hautbiopsien von gesunden Hunden untersucht.

Bei der Untersuchung der **Tumor-infiltrierenden Lymphozyten** in den 4 Regressionsstadien zeigten die CD3+ T-Lymphozyten, CD21+ B-Lymphozyten, CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen einen signifikanten Anstieg von der Gruppe 1 zu den Gruppen 2, 3 und 4. Ein Anstieg der Lymphozyten war zu erwarten, da die Gruppeneinteilung der Histiozytome auf dem Ausmaß der lymphozytären Infiltration basierte (COCKERELL und SLAUSON 1979). Der Nachweis der spezifischen Antigene ergab jedoch Aufschluß darüber, inwieweit einzelne Subpopulationen an diesem Anstieg beteiligt sind. MOORE et al. (1996) stellten in einer immunhistologischen Untersuchung bereits fest, dass es sich bei den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten in Histiozytomen fast ausschließlich um T-Zellen, genauer um CD8+ zytotoxische T-Zellen, handelt und kaum B- Zellen oder CD4+T-Zellen vorhanden sind. Allerdings wurde keine Quantifizierung der Lymphozyten im Verlauf der Regression vorgenommen. Die vorliegende Arbeit, in der eine quantitative Auswertung in 4 Regressionstadien statt fand, bestätigte, dass in allen 4 Gruppen erheblich mehr T-Zellen als B-Zellen vorhanden sind. Darüberhinaus konnte festgestellt werden, dass die von MOORE et al. (1996) ermittelte Dominanz der zytotoxischen T-Zellen nicht für Histiozytome der Gruppe 1, die nur eine geringgradige Infiltration mit Lymphozyten aufweisen, zutrifft. Bei diesen Histiozytomen mit wenigen diffus verstreuten Lymphozyten waren etwa gleich viele T-Helferzellen wie zytotoxische T-Zellen vorhanden. Erst später mit zunehmender lymphozytärer Infiltration überwogen die zytotoxischen T-Zellen deutlich und es kam zu einer signifikanten Änderung des CD4/CD8-Quotienten. Der geringe Anteil der B-Zellen war nicht überraschend, da diese Beobachtung bereits von MOORE et al (1996) gemacht wurde und generell die Immunantwort gegen Tumoren kaum von der humoralen sondern in erster Linie von der zellulären Immunität getragen wird (ROSENBERG 2001 b). Die Präsenz der T-Helferzellen zu Beginn der Regression könnten ausschlaggebend für die Induktion der Immunantwort sein, da T-Helferzellen in der Lage sind Antigene, die MHC II gebunden sind, zu erkennen und durch Sekretion von Zytokinen maßgeblich zur Aktivierung und Proliferation von verschiedenen zytotoxischen Effektorzellen beitragen (MURPHY und REINER 2002). Die hohe Anzahl der zytotoxischen T-Zellen in den Gruppen 2, 3 und 4 könnte

demnach das Resultat der anfänglichen T-Helferfunktion sein. Auch im Falle einer MHC I vermittelten Präsentation auf dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen vermutet man, daß eine gleichzeitige MHC II vermittelte Präsentation in Anwesenheit von T-Helferzellen für eine optimale Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen hilfreich ist (BENNETT et al. 1998).

Die hohe Anzahl von zytotoxische T-Zellen in regressiven Histiocyten bestätigt, dass diese Zellen als die wichtigsten Effektoren der spezifischen Immunantwort gegen Tumoren angesehen werden und gleicht den Beobachtungen, die bei anderen Tumoren gemacht wurden (FOSS 2002; Pardoll 2001). Die zytotoxischen Effektormechanismen der T-Zellen wurden in dieser jedoch Arbeit nicht untersucht und es bleibt offen auf welchem Wege sie zur Reduktion der Tumormasse beitragen. Bei der Bekämpfung von Tumoren kommt dabei vor allem die Perforin/Granzym, die Fas- oder TRAIL-vermittelt Lyse in Frage (ABBAS et al. 2000, KÄGI et al. 1994, SMYTH et al. 2003). Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass nicht die eigene zytotoxische Aktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen, sondern deren Zytokinfreisetzung nach Antigenerkennung und die daraus resultierende Aktivierung unspezifischer Effektorzellen ausschlaggebend für die Wirkung von spezifischen T-Zellen ist. Der theoretische Vorteil dieses Weges bestünde darin, dass ein direkter T-Zell-Rezeptor Kontakt mit den Tumorzellen für das T-Zell „Priming“ nicht notwendig wäre und die indirekte Präsentation von Tumorantigenen auf professionellen APCs ausreichen würde (COHEN et al. 2000). Falls die Tumorzellen wichtige co-stimulatorische Moleküle der reifen dendritischen Zellen exprimieren, wären beim Histiocyten die Voraussetzungen für eine effektive T-Zell Aktivierung durch gleichzeitige Antigenerkennung durch T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen auf einer potenten Antigen-präsentierenden Zelle gegeben.

Eine lymphatische Zellpopulation, die in dieser Untersuchung nicht erfaßt wurde, sind die **NK-Zellen**. Es stand kein Antikörper zur immunhistologischen Markierung kaniner NK-Zellen zur Verfügung. Morphologisch lassen sich NK-Zellen zwar durch ihre Größe, das Kern/Zytoplasma-Verhältnis und azurophile Granula von normalen Lymphozyten unterscheiden (MILLER 2002), aber die Erkennung an Hand dieser

Kriterien war im HE-gefärbten Gewebeschnitt nicht möglich. Auch der mRNA-Nachweis bestimmter Zytokine im Tumorgewebe läßt keinen Rückschluß auf das Vorhandensein von NK-Zellen zu, da keines der untersuchten Zytokine ausschließlich von NK-Zellen gebildet wird.

Mit Hilfe der Antikörper gegen Lysozym und das myeloische/histiozytäre Antigen sollten **Tumor-infiltrierenden Makrophagen** dargestellt werden. Im unveränderten Gewebe des Hundes zeigen Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten sowie Epithelzellen verschiedener Drüsen eine positive Lysozym-Reaktion (MOORE 1986a). Wenngleich die Lysozym-Immunoreaktivität kein verlässlicher diagnostischer Marker für das Histiozytom ist, zeigt ein Teil der Tumorzellen eine positive Reaktion (MOORE 1986b). Infiltrierende Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten ließen sich in einer immunhistologischen Untersuchung von KIPAR et al. (1998) durch ein stärkeres Signal von den schwächer positiven Histiozytomzellen abgrenzen. In der vorliegenden Untersuchung war die Differenzierung von positiven infiltrierenden Entzündungszellen und positiven Tumorzellen an Hand der Intensität des Lysozym-Signals jedoch schwierig, da die Lysozymreaktion der Tumorzellen mitunter ebenso stark war, wie die der infiltrierenden Zellen. Ungeachtet dessen wurde eine quantitative Auswertung der positiven Zellen im Tumorgewebe vorgenommen und ergab einen Anstieg der Lysozym-Immunoreaktivität. In welchem Ausmaß Tumorzellen, Tumor-infiltrierende Makrophagen und neutrophile Granulozyten an der Zunahme positiver Signale beteiligt waren, ließ sich nicht sicher feststellen. Bei den Tumoren, die im HE-Schnitt eine oberflächliche eitrige Entzündung im Bereich der Ulzeration aufwiesen, konnte mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Lysozym-positiven Zellen in der entsprechenden Lokalisation um neutrophile Granulozyten handelt. Die positiven Zellen waren jedoch nicht auf die oberflächlichen Schichten des Tumors begrenzt, sondern lagen auch in anderen Regionen vor. Deshalb war anzunehmen, dass es sich bei einem Großteil der Lysozym-positiven Zellen um Tumor-infiltrierende Makrophagen handelt und diese maßgeblich am Anstieg der Lysozym-positiven Zellen beteiligt sind. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise eine Zunahme der Lysozym-Expression in den

Tumorzellen stattfand, die ebenfalls zum Anstieg der Lysozym-Immunoreaktivität beigetragen haben kann.

Der gegen das myeloische/histiozytäre Antigen gerichtete Antikörper MAC 387 wurde mehrfach beim Hund angewandt um Makrophagen und neutrophile Granulozyten in entzündlichen Läsionen darzustellen (PEREZ et al. 1996 b, DAY und MARTIN 2002). PEREZ et al. (1998) wiesen mit Hilfe dieses Antikörpers infiltrierende Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten im kaninen transmissiblen venerischen Tumor nach. Tumorzellen des malignen fibrösen Histiozytoms und der malignen Histiozytose waren in immunhistologischen Untersuchungen negativ für myeloisches/histiozytäres Antigen (HAYDEN et al. 1993; MORRIS et al. 2002). In der Humanmedizin wird MAC 387 unter anderem eingesetzt, um Tumor-infiltrierende Makrophagen darzustellen und histiozytäre Neoplasien zu differenzieren (FLAVELL et al. 1987). Mit seiner Hilfe könnten dendritische Zellen, die MAC 387-negativ sind, von MAC 387-positiven Monzyten/Makrophagen abgegrenzt werden (FARTATSCH et al. 1990). Im Gegensatz zu Lysozym eignete sich das myeloische/histiozytäre Antigen beim Histiozytom besser als Marker für Tumor-infiltrierende Zellen, da sich diese durch eine intensives Signal eindeutiger von den Tumorzellen abgrenzen ließen. Es galt jedoch auch hier die Einschränkung, dass der Antikörper neutrophile Granulozyten und Makrophagen markiert und durch die dunkle Farbreaktion keine Differenzierung dieser beiden Zelltypen an Hand der Kernmorphologie möglich war. Da bekannt war, dass sich die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im wesentlichen auf die Tumoroberfläche beschränkt, wurde angenommen, dass es sich bei den übrigen positiven Zellen um Makrophagen handelt. Der Anstieg der MAC 387-positiven Zellen von Gruppe 1 zu Gruppe 2 wurde also auf eine Zunahme der Tumor infiltrierenden Makrophagen zurückgeführt. Allerdings muss auch bei diesem Marker berücksichtigt werden, dass eine Teil der positiven Zellen neutrophile Granulozyten sind.

Der Nachweis von Tumor-infiltrierenden Makrophagen in Histiozytomen könnte in verschiedener Hinsicht von Bedeutung sein. Falls die Histiozytomzellen selbst nicht

die Funktion der Antigenpräsentation übernehmen, wäre eine MHC II gebundene Antigenpräsentation über Makrophagen denkbar. Weiterhin besteht die Rolle der Makrophagen möglicherweise in der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 oder $\text{TNF}\alpha$ (FOSS 2002). Der Nachweis einer erhöhten iNOS-Expression in regressiven Histiozytomen kann außerdem auf das Vorhandensein von Makrophagen zurück geführt werden, da Makrophagen über die Bildung von NO einen zytostatischen oder zytotoxischen Effekt ausüben und so zur Reduktion der Tumormasse beitragen können. Allerdings wird den Metaboliten der Makrophagen auch ein proliferationsfördernder Effekt zugesprochen (JENKINS et al. 1995). Schließlich könnte die Anwesenheit von Makrophagen im Tumorgewebe auch als Abräumreaktion zur Phagozytose von nekrotischem bzw. apoptotischem Material interpretiert werden.

Die **neutrophilen Granulozyten** im Bereich der Tumoroberfläche fanden sich vor allem bei ulzerierten Tumoren und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine mechanische Irritation mit Verletzung der Epidermis und sekundärer bakterieller Infektionen zurückzuführen. Sie stehen vermutlich nicht mit einer spezifischen Immunreaktion gegen Tumorantigene in Verbindung. Trotzdem muss bei der Interpretation der Zytokinexpression berücksichtigt werden, dass auch sie die Quelle von Entzündungsmediatoren sein können.

In den Hautbiopsien der gesunden Kontrollhunde waren keine oder nur vereinzelte Lymphozyten zu sehen und MAC 387- oder Lysozym-positive Zellen waren nur als vereinzelte geringgradige perivaskuläre Infiltrate vorhanden. Diese geringe Menge an Entzündungszellen war zu erwarten, anderenfalls läge eine Dermatitis vor und die Hautbiopsie käme nicht als Kontrollprobe in Frage.

Die Charakterisierung der infiltrierenden Zellen bei der Regression des Histiozytoms, weist Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen von PEREZ et al. (1998) auf, der beim kaninen transmissiblen venerischen Sarkom eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen in regressiven gegenüber progressiven Tumoren feststellte. GONZALES et al. (2000) wiesen nach, dass die Regression des transmissiblen venerischen Tumors mit einem Anstieg der CD4+

und CD8+ T-Lymphozyten im Tumorgewebe assoziiert ist. Die immunhistologische Untersuchungen regressiver kaniner oraler Papillome ergab, dass eine Infiltration mit CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten vorliegt, wobei die CD4+ T-Zellen bei diesem Tumor zahlreicher vorhanden waren (NICHOLLS et al. 2001).

Bei der Auswertung des **TUNEL-Essays** waren in den Histiocyten aller vier Gruppen zahlreiche TUNEL-positive Zellen vorhanden, die morphologisch intakt erschienen. Dabei bleibt unklar, ob es sich um präapoptotische Stadien handelt, oder um Zellen, die möglicherweise Kernfragmente phagozytiert haben. Teilweise ließen sich größere Areale von strukturlosem Material anfärben, was auf die Schwierigkeit hinweist, mit dieser Methode eine Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose vorzunehmen. Es ist bekannt, dass die Detektion von apoptotischen Zellen oft mit technischen und methodischen Fehlern behaftet ist und es wird empfohlen mehr als eine Methode zur Auswertung heranzuziehen (SOINI et al. 1998). Deshalb wurden, um auszuschließen, dass die Auswertung durch falsch positive Signale verfälscht wird, Zellen mit positiver TUNEL-Reaktion und morphologischen Merkmalen der Apoptose getrennt gezählt und zusätzlich gesonderten ausgewertet. In beiden Berechnungen ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise darauf, daß die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den 4 Tumorgruppen signifikante Unterschiede aufweist. Da bekannt ist, dass zytotoxische Effektorzellen durch Liganden der TNF α -Superfamilie, FAS-Ligand oder Perforin/Granzym die Apoptose von Tumorzellen (ABBAS et al. 2000) auslösen, wäre eine Zunahme von apoptotischen Zellen in regressiven Histiocyten mit ausgeprägter lymphozytärer Infiltration zu erwarten gewesen. Auch bei anderen Tumoren konnte jedoch der apoptotische Index nicht mit dem biologischen Verhalten korreliert werden. Dies deutet darauf hin, dass bei der Bewertung von Zelluntergängen in Tumoren nicht nur der apoptische Index berücksichtigt werden muss, sondern auch die Proliferationsrate und unter Umständen das Ausmaß der Nekrose (SOINI et al. 1998). Eine niedrige Zahl von apoptotischen Zellen in Verbindung mit hoher FAS-Ligand Expression wurde bei der humanen Langerhanszell Histiozytose auf einen raschen „turn over“ durch Phagozytose von Zellrückständen zurückgeführt (PETERSEN et al. 2003).

Bei der Auswertung des TUNEL-Essays der gesunden Kontrollhunde waren in der ohnehin zellarmen und bindegewebsreichen Propria und Subkutis keine apoptotischen Zellen zu sehen. In der Epidermis fanden sich zum Teil TUNEL-positive Keratinozyten, die bei der Auswertung jedoch nicht mitgezählt wurden. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um ein physiologisches Phänomen im Zuge der Keratinisierung handelt.

Bei der Untersuchung der **Zytokin und iNOS mRNA-Expression** mittels „real-time“ PCR in den 4 Tumorgruppen konnte ein signifikanter Anstieg der IL-2, IFN γ , TNF α und iNOS Expression von Gruppe 1 zu den Gruppen 2, 3 und 4 festgestellt werden. Für IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 sowie für die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede im Verlauf der lymphozytären Infiltration.

IL-2 wurde nur in einem der Histiozytome in Gruppe 1 nachgewiesen hingegen in 80-90% der Histiozytome in den Gruppen 2, 3 und 4. Bei der Betrachtung der relativen semiquantitativen Werte war eine 40- bis 50-fache Erhöhung des Medians von Gruppe 1 zu den übrigen 3 Gruppen zu verzeichnen. Dieser Anstieg der IL-2-Expression bei zunehmender lymphozytärer Infiltration des Histiozytoms steht im Einklang mit der Tatsache, daß IL-2 *in vivo* ausschließlich von aktivierten T-Zellen gebildet wird und bestätigt seine Funktion als Proliferations- und Aktivierungsfaktor für T-Zellen. Bei der Regression des Histiozytoms wäre denkbar, dass IL-2 zunächst nach Antigenkontakt von Tumor-infiltrierenden T-Helferzellen gebildet wird und die Infiltration der zytotoxischen Effektorzellen, so auch der zahlreichen zytotoxischen T-Zellen, in späteren Stadien der Regression nach sich zieht. Die dann in größere Anzahl vorhandenen T-Zellen könnten ebenfalls IL-2 bilden und einen weiteren Anstieg der IL-2 mRNA hervorrufen. Durch die Unterstützung der zytolytischen Funktion von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ist IL-2 möglicherweise beim Histiozytom für die Reduzierung der Tumorzellen mit verantwortlich. Neben seiner Wirkung als Proliferationsfaktor für T-Zellen ist IL-2 vor allem durch seine Fähigkeit die zytolytische Aktivität von CD8 $^{+}$ T-Zellen und NK-Zellen zu erhöhen in das

Interesse der Immuntherapie geraten und wird inzwischen bei verschiedenen Tumorerkrankungen therapeutisch eingesetzt (FENHINGER et al. 2002).

IFN γ mRNA konnte in der Gruppe 1 nicht nachgewiesen werden, wohingegen, bis auf eine Ausnahme in Gruppe 4, alle Proben in den übrigen drei Gruppen positiv für IFN γ waren. Die semiquantitativen Werte im Verhältnis zur Aktin-Expression zeigten somit einen deutlichen Anstieg des Medians von Gruppe 1 zu den Gruppen 2, 3 und 4. Im Rahmen der erworbenen Immunität sind CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die Hauptquelle von IFN γ und die Synthese setzt in diesen Zellen nach Antigenkontakt des T-Zell Rezeptors ein. In Übereinstimmung damit begann in den untersuchten Histiocyten die Expression von IFN γ erst in Gruppe 2, als bereits eine deutliche Zunahme der infiltrierenden Lymphozyten stattgefunden hatte. IFN γ ist ausschlaggebend für die Entstehung einer Th1-Immunantwort und begünstigt die Entwicklung und Funktion der zytotoxischen T-Zellen. Die Aufregulation der IFN γ -Expression im Verlaufe der Tumorregression des Histiocyts spricht dafür, daß IFN γ möglicherweise durch Aktivierung der zytolytischen T-Zellen eine ausschlaggebende Rolle für die Rückbildung des Histiocyts spielt. Den NK-Zellen kommt ebenfalls eine wichtige Funktion zu, da sie einerseits IFN γ synthetisieren können und andererseits nach Stimulation durch IFN γ selbst in ihrer zytolytischen Funktion aktiviert werden und Faktoren wie TRAIL oder Perforin freisetzen (IKEDA et al. 2002). In wieweit bei der Regression des Histiocyts neben den T-Lymphozyten auch NK-Zellen für die Synthese von IFN γ oder für den zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen verantwortlich sind, konnte nicht ermittelt werden. Weiterhin besitzt IFN γ eine Funktion im Rahmen der angeborenen Immunität, indem es Makrophagen aktiviert, die durch Bildung von reaktiven Stickstoff- bzw. Sauerstoffverbindungen und durch Aufregulation von Liganden der TNF α -Superfamilie die Lyse von Tumorzellen erzielen können (IKEDA et al. 2002). In der vorliegenden Untersuchung setzte in der Gruppe 2 gleichzeitig mit IFN γ auch die iNOS mRNA Expression ein. Dieser Zusammenhang weist darauf hin, dass durch IFN γ möglicherweise eine Aktivierung der Tumor-infiltrierenden Makrophagen mit Bildung von reaktiven Stickstoffverbindungen ausgelöst wurde.

TNF α mRNA war, abgesehen von einem negativen Histiozytom in Gruppe 1, in allen Histiozytomen nachweisbar. Bei der semiquantitativen Auswertung waren jedoch die relativen Werte der regressiven Histiozytome in den Gruppen 2, 3 und 4, bei denen eine ausgeprägte entzündliche Infiltration vorlag, mit etwa 12-fach höher als in Gruppe 1. **TNF α** ist ein wichtiges Effektormolekül für die CD8+T-Zell und NK-Zell vermittelte Lyse von immunogenen Tumorzellen. In verschiedenen experimentellen Tumormodellen zeigt hoch dosiertes, lokal verabreichtes **TNF α** einen positiven Effekt, insbesondere in Verbindung mit IFN γ oder Chemotherapeutika. Dabei scheint vor allem die selektive Zerstörung der Gefäßversorgung ausschlaggebend zu sein. Außerdem kann es durch Bindung an **TNF α** -Rezeptoren die Apoptose von Zielzellen auslösen. Es übt andererseits auch einen positiven Effekt auf das Wachstum von Tumoren aus, denn durch chronischen niedrig dosierten **TNF α** -Einfluß wird die DNA-Mutagenese durch reaktive Stickstoffverbindungen und die Ausbildung eines Tumorstromas begünstigt, so dass **TNF α** als endogener Tumorpromotor wirken kann. **TNF α** wird von einer Reihe von humanen Tumoren exprimiert und die Präsenz dieses Zytokins ist zum Teil mit einer schlechten Prognose assoziiert. (BALKWILL 2002). Obwohl es möglich wäre, dass **TNF α** von den Histiozytomzellen gebildet wird und initial zu der Progression des Tumors beiträgt, spricht der starke Anstieg der mRNA-Expression mit zunehmender Entzündungszellinfiltration dafür, dass hauptsächlich infiltrierende Makrophagen oder Lymphozyten die Ursprungszellen dieses Zytokins sind. Bei der experimentellen Therapie von induzierten Tumoren ist eine hohe lokale Konzentration von **TNF α** notwendig, um die Nekrose des Tumorgewebes zu verursachen (BALKWILL 2002). Daraus könnte man ableiten, dass beim Histiozytom erst wenn eine massive Entzündungszellinfiltration und Zytokinsynthese statt findet, **TNF α** in ausreichender Konzentration vorhanden ist und so die lytischen Effekte gegenüber den proliferativen Effekten überwiegen.

Bei der Untersuchung der Histiozytome konnte **IL-12** nur in einem Histiozytom der Gruppe 1, in keinem der Gruppe 2 und in etwa der Hälfte der Histiozytome in den Gruppen 3 und 4 nachgewiesen werden. Bei der quantitativen Auswertung der IL-12 Expression war dadurch ein Anstieg von 0% in den ersten 3 Gruppen auf 33,6% in

Gruppe 4 in Bezug zur Aktinexpression zu verzeichnen. Dieser Anstieg erwies sich allerdings nicht als statistisch signifikant. IL-12 ist ein Zytokin, das von phagozytierenden Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen nach Antigenkontakt exprimiert wird. Es wirkt auf T-Zellen und NK-Zellen indem es deren Proliferation bewirkt, ihre zytotoxischen Funktion aktiviert und die Bildung von Zytokinen insbesondere von IFN γ in diesen Zellen induziert. Es ist ein wichtiges Verbindungsglied zwischen der natürlichen und der erworbenen Immunität und dirigiert die T-Helferzellen in Richtung Th1, wodurch eine zytotoxische T-Zell Antwort vermittelt wird. Daher hätte man erwarten können, dass bei der Regression des Histiocytems schon initial eine gewisse IL-12 Konzentration vorhanden ist. Die überwiegend negativen Histiocytoeme zu Beginn der Regression und die uneinheitliche Expression dieses Zytokins in den späteren Stadien weist jedoch darauf hin, dass IL-12 für den Verlauf der Tumorregression nicht von essentieller Bedeutung ist oder erst im späteren Stadien der Regression eine unterstützende Funktion hat. Ob IL-12 in den positiven Histiocytoemen von den Tumorzellen oder von den Tumor-infiltrierenden Makrophagen gebildet wird bleibt unklar. Die Zunahme der IL-12 Expression in den Gruppen mit ausgeprägter Entzündungszellinfiltration macht es jedoch wahrscheinlicher, dass Makrophagen die Quelle dieses Zytokins sind. In verschiedenen experimentellen Tumormodellen hat rekombinantes IL-12 einen dramatischen Anti-Tumor-Effekt auf transplantierte, chemisch induzierte oder in genetisch modifizierten Mäusen spontan entstandene Tumoren. Dieser inhibitorische Effekt basiert hauptsächlich auf der Induktion von IFN γ und der daraus folgenden Aktivierung von Effektorzellen. Trotz des erstaunlichen Anti-Tumor-Effektes von IL-12 in experimentellen Studien zeigte der therapeutische Einsatz in ersten klinischen Studien nur geringen Erfolg und war mit einer hohen Toxizität verbunden (COLOMBO und TRINCHIERI 2002)

IL-1 wurde in keinem der Histiocytoeme der Gruppe 1, in 2 von 5 Histiocytoemen der Gruppe 2, in 3 von 10 Histiocytoemen der Gruppe 3 und in 4 von 9 Histiocytoemen der Gruppe 4 nachgewiesen. Die mRNA Mengen waren jedoch sehr gering, so dass der Median der relativen Werte in allen 4 Gruppen bei 0% lag und sich bei der statistischen Auswertung der semiquantitativen Werte keine gruppenspezifischen

Unterschiede nachweisen ließen. Daraus kann man schlußfolgern, dass IL-1 für die Regression des Histiocytems keine bedeutende Rolle spielt. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass IL-1 mRNA eine geringe Halbwertszeit hat (SCHINDLER et al. 1990) und der fehlende Nachweis der mRNA nicht zwingend bedeuten muss, dass zu keinem Zeitpunkt biologisch aktives IL-1 vorhanden war.

IL-6 konnte in sämtlichen Histiocyten der 4 Gruppen nachgewiesen werden. In Gruppe eins war der Median der semiquantitativen Werte gegenüber den folgenden 3 Gruppen leicht erhöht, allerdings erwies sich der Unterschied nicht als statistisch signifikant. Von welchem Zelltyp IL-6 gebildet wird lässt sich bei diesem Versuchsaufbau nicht sagen, allerdings kann das Vorhandensein in Gruppe 1, in der nur wenige Entzündungszellen vorliegen und die fehlende Aufregulation im Verlaufe der Infiltration mit Lymphozyten und Makrophagen dafür sprechen, dass dieses Zytokin von den Histiocytenzellen synthetisiert wird. Möglicherweise trägt IL-6 durch seine allgemein pro-inflammatorische Wirkung zur Regression des Histiocytems bei.

Das Chemokin **IL-8** waren in allen Tumoren nachweisbar und die semiquantitativen Werte in den 4 Gruppen bewegten sich auf dem selben Niveau, so dass keine Gruppen-spezifischen Expressionsunterschiede festgestellt wurden. Auch hier ist nicht sicher von welcher Zelle IL-8 gebildet wird, es lässt sich lediglich feststellen, dass das Maß der Expression nicht mit der Zunahme der Entzündungszellinfiltration assoziiert ist. Neben seiner Fähigkeit chemotaktisch auf Leukozyten zu wirken, ist für IL-8 eine Wirkung als Wachstumsfaktor für Tumoren bekannt. Es fördert die Proliferation von humanen malignen Melanomen, was vermutlich durch verstärkte Angiogenese bedingt ist (FLANAGAN et al. 2002). In welchem Maße IL-8 beim Histiocytem eine proliferative Wirkung durch verstärkte Angiogenese oder einen inhibitorischen Einfluß durch die Anziehung von Effektorzellen ausübt bleibt unklar.

Das anti-inflammatorische Zytokin **IL-10** konnten in allen Histiocyten nachgewiesen werden und beim Vergleich der semiquantitativen Ergebnisse in den 4 Gruppen war keine signifikante Auf- oder Abregulation feststellbar. IL-10 mRNA konnte bei anderen Untersuchungen in verschiedenen frisch exzidierten Tumoren nachgewiesen werden und wird von zahlreichen Tumorzelllinien gebildet. Die

biologische Bedeutung der IL-10 Produktion durch Tumorzellen ist nicht sicher. Die Proliferationsrate von Tumorzellen kann durch IL-10 erhöht werden und es wird möglicherweise von Tumoren sezerniert, um sich durch seine immunsuppressive Wirkung der Immunüberwachung zu entziehen (MOCELLIN et al. 2001). Beim Histiozytom scheint die Sekretion von IL-10 die Ausbildung eines Th1-Zytokinprofils und die Induktion der zellulären Immunantwort nicht verhindert zu haben.

TGF β mRNA war ebenfalls in sämtlichen Histiozytomen nachweisbar und die semiquantitativen Werte lagen in den 4 Gruppen in der selben Größenordnung, so dass auch in diesem Fall das Ausmaß der lymphozytären Infiltration nicht mit einer veränderten Zytokin Expression einherging. TGF β gilt als ein stark immunsuppressives Molekül. Es soll der Funktion von IL-2 entgegensteuern und die Aktivierung und Ausbreitung von zytotoxischen T-Zellen verhindern. *In vitro* und *in vivo* wird TGF β von verschiedenen Tumortypen exprimiert. Allerdings korrelieren TGF β -Spiegel bei einigen Tumortypen positiv, z.B. bei humanen Mamma- oder Pankreaskarzinomen, und bei anderen Tumortypen negativ mit der Prognose, wie bei Magen- oder Lungenkarzinomen festgestellt wurde (MOCELLIN et al. 2001). Im Fall des Histiozytoms scheint die immunsuppressive Wirkung von TGF β nicht ausgereicht zu haben, um eine effektive zelluläre Immunantwort zu unterbinden.

Als Gen, das im Rahmen eines zytolytischen Effektormechanismus aktiv ist, wurde lediglich die **iNOS** Expression untersucht. Der Nachweis von iNOS mRNA sollte die Aktivität der Makrophagen widerspiegeln um zu beleuchten, ob Tumor-infiltrierende Makrophagen eine Rolle bei der Regression des Histiozytoms spielen. Da die Histiozytomzellen von dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen ausgehen, ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch sie in der Lage sind, iNOS zu exprimieren. In der Gruppe 1 konnte keine iNOS mRNA nachgewiesen werden. In den Gruppen 2, 3 und 4 war iNOS mRNA in 60%, 70% bzw 78% der Histiozytome nachweisbar. Die statistische Auswertung der semiquantitativen Ergebnisse in Relation zur Aktinexpression ergab einen signifikanten Gruppenunterschied mit einem deutlichen Anstieg des Medians von der Gruppe 1 zu den folgenden Gruppen. Durch die Bildung von reaktivem NO ist das Enzym iNOS ein wichtiger Faktor für die

zytotoxische Aktivität von Makrophagen und seine Aktivität wird von Zytokinen, insbesondere von $\text{IFN}\gamma$, angeregt (COLOMBO und TRICHINERI 2002). In der vorliegenden Untersuchung setzte die iNOS mRNA-Expression gleichzeitig mit der $\text{IFN}\gamma$ mRNA-Expression in Gruppe 2 ein. Die Aufregulation von iNOS könnte demnach darauf hinweisen, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen durch $\text{IFN}\gamma$ aktiviert werden und zur Reduktion der Tumormasse beitragen. Bei der Bewertung der iNOS Aktivität darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass das Reaktionsprodukt NO nicht nur inhibitorisch auf Tumoren wirkt, sondern durch Oxidation mutagene DNA Schäden verursachen und die Proliferation von Tumoren begünstigen kann (BALKWILL 2002).

Auf Grund der uneinheitlichen und geringen Genexpression in der Kontrollhaut gesunder Hunde wurde die Zytokin bzw. iNOS mRNA-Expression nur qualitativ gemessen. Erstaunlicherweise konnte IL-2, IL-12 und iNOS mRNA in einem höheren Prozentsatz der unveränderten Hautproben, als in den Histozytomen der Gruppe 1 nachgewiesen werden, obwohl in der Haut weniger Lymphozyten bzw. Makrophagen nachweisbar waren. Die Bedeutung dieses Befundes für das Krankheitsgeschehen bleibt unklar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zunehmende Entzündungszellinfiltration bei der Regression des Histozytoms mit verstärkter Expression von IL-2, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ einhergeht. Dabei handelt es sich um Th1-Zytokine, die klassischerweise die Funktionen der zelluläre Immunität unterstützen. Bei den übrigen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede in den vier Regressionstadien. Eine gleichmäßig starke Zytokin mRNA-Expression muss jedoch nicht zwingend bedeuten, dass diese Zytokine unwichtig für den Verlauf der Regression sind. Bei der Messung der Zytokinsynthese auf der Transkriptionsebene sollte stets berücksichtigt werden, dass die Konzentrationen der Endprodukte, also der bioaktiven Zytokinmoleküle, auch von der Aktivität extrazellulärer Proteasen beeinflusst wird. Zudem hängt der resultierende Effekt eines Zytokins von zahlreichen anderen synergistischen und antagonistischen Faktoren im Tumormilieu ab. Weiterhin war in den Histozytomen mit deutlicher

Entzündungszellinfiltration vermehrt iNOS mRNA nachweisbar, die als Hinweis auf eine Aktivierung von Makrophagen interpretiert werden kann. Man kann vermuten, dass durch die starke Expression von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von IFN γ , die NO-Synthese in Makrophagen induziert wurde.

Beim kaninen kutanen Histiozytom handelt es sich nach dem heutigen Kenntnisstand um einen Tumor, der von dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) ausgeht, einer Zellpopulation, die von großem Interesse für die Entwicklung von therapeutischen Strategien gegen Tumorerkrankungen ist. Da es beim Histiozytom offensichtlich zu einer Immunantwort des Wirtes kommt, stellt sich die Frage, ob es möglicherweise ein interessantes Modell für die Regression von Tumoren darstellt.

Bei unterschiedlichen Vakzinierungsstrategien, die eine verbesserte Prozessierung von Tumorantigenen durch aktivierte professionelle Antigen-präsentierenden Zellen zum Ziel haben, kam es im Tiermodell zu einer T-Zell vermittelten Reduktion der Tumormasse. Vor diesem Hintergrund stellt LEVITSKY (1996) die Frage, warum Tumoren, die von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen ausgehen, existieren können, wenn doch experimentell die Verarbeitung und Präsentation von Tumorantigenen durch diese Zellen in einer spezifischen Immunantwort resultiert. Zu den humanen Neoplasien der APCs im weiteren Sinne gehören bestimmte B-Zell-Lymphome und -Leukämien sowie verschiedene myeloische Neoplasien. Was dendritische Antigen-präsentierende Zellen betrifft, stellt der Autor in Frage, ob echte maligne Tumoren dieser Zellpopulation überhaupt vorkommen. Die transformierten Zellen der Histiozytose X, einer seltenen Erkrankung des Menschen, weisen Charakteristika dendritischer Zellen auf, die exakte Zuordnung einer Zelllinie ist nach Angabe des Autors jedoch unsicher. Die Tatsache, dass Neoplasien dendritischer Zellen beim Menschen selten sind, kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass sie, durch ihre einmalige Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, ihre eigene Elimination hervorrufen, sobald sie Tumor-assoziierte Antigene exprimieren. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Seltenheit von Neoplasien der dendritischen APCs ist, dass es sich bei reifen dendritischen Zellen um ausdifferenzierte Zellen

handelt, was die Wahrscheinlichkeit ihrer Transformation geringer macht. (LEVITSKY 1996)

Beim Hund gibt, es wie im Kapitel 2.1. und 2.2. beschrieben, verschiedene z.T. relativ häufig auftretende histiozytäre Erkrankungen, bei denen zur Zeit davon ausgegangen wird, dass sie von dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen abstammen. Allerdings ist auch bei den histiozytären Proliferationen des Hundes in einigen Fällen umstritten, inwieweit es sich um reaktive Proliferation oder um echte Neoplasien handelt und welche die Ursprungszellen der verschiedenen Neoplasien sind. Erschwerend kommt hinzu, dass beim Hund geeignete Antikörper zum Nachweis von Differenzierungsantigenen oft nicht zur Verfügung stehen. Laut MARCHAL et al. (1995) könnten histiozytäre Erkrankungen des Hundes als Modell für humane Erkrankungen dienen. So weist das kutane Histiocytom des Hundes nach Ansicht der Autoren Ähnlichkeiten mit der Hashimoto-Pritzker Krankheit des Menschen auf. Dabei handelt es sich um eine kongenitale Form der Langerhanszell Histiocytyse, die spontan ausheilt („congenital self-healing langerhans cell histiocytosis“); (LARRALDE et al. 1999). Falls die Tumorzellen des Histiocytems wichtige co-stimulatorische Moleküle der reifen dendritischen Zellen exprimieren, wären beim Histiocytom die Vorraussetzungen für eine effektive T-Zell Aktivierung durch gleichzeitige Antigenerkennung durch T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen auf einer potenten Antigen-präsentierenden Zelle gegeben. Bislang wurde eine vermehrte Expression von MHC I, MHC II und ICAM-1 auf Histiocytomen, die lymphozytäre Infiltrate aufweisen festgestellt (KIPAR et al. 1998; BAINES et al. 2000). Genauere Untersuchung zur Antigenpräsentation auf den Histiocytomzellen wären notwendig.

Wenn sich nachweisen ließe, dass die Tumorzellen des Histiocytems Neoantigene in Verbindung mit co-stimulatorischen Molekülen präsentieren und auf diesem Wege selber die T-Zell Antwort induzieren, wäre die Regression des Histiocytems in gewissem Maße eine Bestätigung der These von LEVITSKY (1996), dass dendritische APC-Neoplasien ihre eigene Elimination in die Wege leiten. Vor diesem Hintergrund könnten die Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt ausgelegt werden:

Als transformierte dendritische APCs könnten die Histiozytomzellen Tumorspezifische Antigene in Verbindung mit den adäquaten Molekülen, die für eine ausreichende Aktivierung von T-Zellen notwendig sind, exprimieren. Durch die nachgewiesene Präsenz von T-Helferzellen im frühen Stadien der Regression, könnte es zur MHC II gebundenen Antigenerkennung durch T-Helferzellen und zur Sekretion von IL-2 kommen. Daraus könnte eine Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen Effektorzellen resultieren und es käme zu der starken Zunahme der infiltrierenden Lymphozyten, insbesondere der CD8+ zytotoxischen T-Zellen, wie ab Gruppe 2 beobachtet wurde. Die zunehmende lymphozytäre Infiltration könnte den signifikanten Anstieg der IL-2- und IFN γ -Expression, der im weiteren Verlauf der Regression gezeigt wurde, hervorrufen. Diese Zytokine könnten die zytolytische Aktivität von CTLs unterstützen und so möglicherweise den Untergang von Tumorzellen einleiten. Durch die Freisetzung von Zytokinen wie IL-2 oder IFN γ könnten aber auch Effektorzellen der natürlichen Immunität, wie NK-Zellen oder Tumor-infiltrierende Makrophagen, die wir mittels MAC387 vermehrt ab Gruppe 2 nachweisen konnten, aktiviert werden. Da aktivierte Makrophagen mit Hilfe des Enzyms iNOS zytotoxische Stickstoffverbindung bilden, kann die nachgewiesene Zunahme der iNOS Expression im Verlaufe der Regression, dafür sprechen, dass beim kutanen Histiozytom auch Makrophagen eine inhibitorische Wirkung auf das Tumorstadium ausüben. Außerdem könnte in den aktivierten Makrophagen, aber auch in Lymphozyten, eine verstärkte TNF α -Synthese einsetzen. Dabei handelt es sich um ein weiteres Zytokin, das ebenfalls die Lyse von Tumorzellen hervorrufen kann und das in der vorliegenden Arbeit im Verlaufe der Regression des Histiozytoms vermehrt nachgewiesen wurde.

Es bleibt offen, wodurch die Tumorzellen des Histiozytoms als fremd erkannt werden und wie die initiale Antigenerkennung einsetzt. Eine genauere Untersuchung der Antigenexpression auf den Tumorzellen wird notwendig sein, um die Induktion der Immunantwort beim Histiozytom besser zu verstehen. Weiterhin wurde nicht nachgewiesen, mit Hilfe welcher Effektormechanismen die infiltrierenden Zellen ihre zytotoxischen bzw. zytostatische Wirkung ausüben. Um außer der Rolle der Makrophagen auch die zytolytische Funktionen der T-Zellen und der NK-Zellen zu

berücksichtigen, sollte in folgenden Untersuchungen die Expression von Granzym/Perforin, FAS-Ligand oder Liganden der TNF α -Superfamilie untersucht werden.

Beim Einsatz von RNA aus ganzen Gewebeschnitten ist der Nachteil der RT-PCR, dass nicht einzelne Zellpopulationen, die ein gesuchtes Gen exprimieren, identifizieren werden können. Deshalb war bei diesem Versuchsaufbau nicht zu erkennen, ob ein bestimmtes Zytokin von Tumorzellen, infiltrierende Lymphozyten oder anderen Zellen im Umfeld des Tumors gebildet wurde. In zukünftigen Untersuchungen könnte die Zytokin-Expression in den entzündlichen Infiltraten und in den Tumorzellarealen, z.B. mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion, getrennt untersucht werden, um den genauen Bildungsort der nachgewiesenen Zytokine zu bestimmen.

Generell besteht bei der Betrachtung eines natürlich auftretenden Tumors die Einschränkung, dass nicht die Möglichkeit besteht, den Vorgang unter Ausschluß eines bestimmten Zytokins oder einer spezifischen zytotoxischen Effektorfunktion zu betrachten, wie es im Tierversuch mit Gen-defizienten Mäusen praktiziert wird. Aus diesem Grunde bleibt die Bedeutung einzelner Mechanismen für die Regression des Tumors Spekulation, denn letztlich wäre nur das Ausbleiben der Regression bei Defizienz des entsprechenden Gens beweisend. So bleibt unsicher, ob das beschriebene Zytokinprofil in einem kausalen Zusammenhang mit der Regression steht, oder ob es nur das unspezifische Nebenprodukt einer lympho-histiozytären Entzündung ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das kanine kutane Histiozytom, ein benigner histiozytärer Hauttumor, der besonders häufig bei jungen Hunden auftritt und bei dem in der Regel innerhalb weniger Wochen eine Spontanregression eintritt. Als Ursprungszellen dieser Neoplasie wurden die Langerhans-Zellen der Haut, die zu der Reihe der dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen gehören, identifiziert. Ziel der Arbeit war es, festzustellen, ob die Regression des Histiozytoms durch ein spezifisches Zytokinmuster und das Auftreten bestimmter Entzündungszellpopulationen im Tumorgewebe, gekennzeichnet ist. Weiterhin sollte ermittelt werden, inwieweit Stickstoffmonoxid (NO) und Tumorzell-Apoptose eine Rolle bei der Tumorregression spielen.

In der Literaturübersicht wird der aktuelle Kenntnisstand zur Pathologie des kaninen kutanen Histiozytoms und eine Übersicht über weitere histiozytäre Proliferationen des Hundes wiedergegeben. Außerdem werden die Mechanismen der Immunantwort gegen Tumoren kurz erläutert und Beispiele für Spontanregression bei natürlich auftretende Tumoren genannt.

In die eigenen Untersuchungen wurden 30 Histiozytome einbezogen, die nach Menge und Muster der lymphozytären Infiltration in 4 Gruppen unterteilt wurden. Hierbei wurden Tumorgruppen mit zunehmend stark ausgeprägten entzündlichen Veränderungen unterschieden, die die Stadien der fortschreitenden Tumorregression repräsentieren sollen. Zunächst wurde eine immunhistologische Charakterisierung der Tumor-infiltrierenden Entzündungszellen in den verschiedenen Gruppen vorgenommen. Die Subpopulationen der infiltrierenden Lymphozyten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD3 ϵ -, CD21(like)-, CD4- und CD8-Antigen an Gefrierschnitten immunhistologisch identifiziert und die durchschnittliche Zellzahl pro Flächeneinheit ermittelt. Tumor-infiltrierende Makrophagen wurden an Hand von Lysozym und myeloischem/histiozytärem Antigen dargestellt und auf gleiche Weise quantifiziert. Mit der TUNEL-Methode wurde der apoptotische Index ermittelt. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde mRNA aus Gefrierschnitten der Histiozytome isoliert und die Expression von ausgewählten Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10,

IL-12, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TGF}\beta$) und der induzierbaren NO-Synthase durch Reverse Transkription und anschließende semiquantitative „real-time“ PCR untersucht.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben einen signifikanten Anstieg der T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und der Makrophagen im Verlaufe der Regression. Der Vergleich der Lymphozyten-Subpopulationen zeigte, dass die Anzahl der T-Lymphozyten gegenüber den B-Lymphozyten in allen Gruppen stark überwog. Die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen ergab, dass beide Zellpopulationen zu Beginn der Regression in gleichem Maße vertreten waren. Erst mit Zunahme der lymphozytären Infiltration kam es zu einer Dominanz der zytotoxischen T-Zellen und somit zu einer signifikanten Änderung des CD4/CD8 Quotienten. Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen ergab keine relevanten Änderungen des apoptischen Index innerhalb der Tumorguppen. Die Ergebnisse der semiquantitativen „real-time“ PCR zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression von IL-2, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und iNOS mit Zunahme der Entzündungszell Infiltration. Bei den Zytokinen IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und $\text{TGF}\beta$ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Regressionstadien.

Die Ergebnisse zeigten einen relativ hohen Anteil an T-Helferzellen zu Beginn der Tumorregression. Dies bestätigt die Bedeutung dieser Zellen für die Antigenerkennung und Induktion der Immunantwort. Die Zunahme der infiltrierenden Entzündungszellen war mit einem signifikanten Anstieg der Expression von IL-2, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ assoziiert. Durch die Aufregulation dieser Th1-Zytokine könnten die Effektorfunktionen der zellulären Immunantwort maßgeblich unterstützt werden und die Lyse von Tumorzellen in die Wege leiten. So konnte eine signifikante Zunahme von myeloischem/histiozytärem Antigen-positiven Zellen und ein Anstieg der iNOS mRNA im Verlaufe der Regression festgestellt werden, was auf eine Aktivierung von Tumor-infiltrierenden Makrophagen hinweist. Daraus könnte man schließen, dass nicht nur die zahlreich vorhandenen zytotoxischen T-Zellen im Rahmen der spezifischen Immunität einen Anti-Tumor-Effekt ausüben, sondern auch Makrophagen als Zellen der natürlichen Immunität zur Reduktion der Tumormasse beitragen.

7 SUMMARY

Subject of the present investigation is the canine cutaneous histiocytoma, a benign histiocytic tumor that most commonly occurs in young dogs and usually displays spontaneous regression within few weeks. The epidermal Langerhans cells, which belong to the lineage of dendritic antigen-presenting cells are identified as the origin of this neoplasm. The aim of this study was to determine whether the regression of canine cutaneous histiocytoma is associated with the expression of a distinct cytokine profile and with the presence of certain inflammatory cells. Furthermore, the role of nitric oxide (NO) and tumor cell-apoptosis for tumor regression was elucidated.

The pathology of canine cutaneous histiocytoma as well as the current classification of other histiocytic tumors are reviewed. Furthermore, the mechanisms of anti-tumor immunity are briefly described and examples for spontaneous regression of naturally occurring neoplasms are given.

30 histiocytomas were included in this study. The tumors were divided into 4 groups according to the number and distribution of infiltrating lymphocytes. Tumor groups were distinguished by the increasing degree of inflammatory alterations to represent various stages of ongoing regression. Tumor-infiltrating inflammatory cells were characterized by immunohistochemistry. Different subpopulations of infiltrating lymphocytes were identified on frozen tissue sections using specific antibodies against CD3 ϵ -, CD21(like)-, CD4- or CD8- antigen and the average number of positive cells per square unit was determined. Tumor-infiltrating macrophages were detected by lysozym- or myeloid/histiocytic antigen-immunoreactivity in paraffin-embedded sections and quantified as mentioned above. The TUNEL-method was used to compare the apoptotic index of histiocytomas in the different groups. In the second part of the study, mRNA was isolated from frozen tissue sections and the expression of certain cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , IFN γ , TGF β) and inducible NO-Synthase (iNOS) was measured by semiquantitative real-time PCR following reverse transcription.

Immunohistochemistry revealed a significant increase in the number of T-cells, B-cells and myeloid/histiocytic antigen-positiv cells during tumor regression. The comparison of the different lymphocytes subsets revealed that far more T-cells than B-cells were detectable in all groups. Cytotoxic T-cells and T-helpercells were both present in equal numbers at the beginning of tumor regression, whereas cytotoxic T-cells became the dominant cell type with increase of inflammatory infiltration, leading to a significant change in the CD4/CD8 ratio. The quantification of TUNEL-positiv cells revealed no significant changes of the apoptotic index within the different groups. The results of the semi-quantitative real-time PCR showed an up-regulation of the expression of IL-2, TNF α , IFN γ and iNOS with the increase of infiltrating inflammatory cells. For IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TGF β no signifikant differences between the stages of regression were observed.

The high proportion of T-helper cells at the beginning of tumor regression underlines the importance of these cells in antigen recognition and induction of tumor regression. The increased number of infiltrating inflammatory cells was associated with a significant increase of IL-2-, TNF α - and IFN γ -expression. The up-regulation of these Th1- cytokines could support cellular immunity and possibly mediate tumor cell lysis. Furthermore an increase of myeloid/histiocyte antigen-positive cells and an increase of iNOS mRNA was detected. The latter could indicate an activation of tumor-infiltrating macrophages and suggests that in addition to tumor-specific cytotoxic lymphocytes also macrophages as cells of the innate immunity could contribute to the reduction of the tumor mass.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (2000). Effector mechanisms of cell mediated immunity: 291-308; Immunity to Tumors: 384-403 in Cellular and Molecular Immunology, Fourth Edition. W.B. Saunders Company

Affolter V.K. (1998). Histiozytäre Proliferationen beim Hund: reaktive und neoplastische Langerhans-Zell-Histiozytosen. 44. Jahrestagung der DVG Fachgruppe Kleintier 19.-22. Nov., Stuttgart

Affolter V.K. (2000). Histiocytes and the skin. Vet Dermatol 11 (Suppl.1): 9

Affolter V.K., Moore P.F. (2000). Canine cutaneous and systemic histiocytosis: reaktive histiosis of dermal dendritic cells. Am J Dermatopathol 22 : 40-48

Affolter V.K., Moore P.F. (2002). Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. Vet Pathol 39: 74-83

Baines S.J., Bujdoso R., Blacklaws B.A., Mc Innes E., Moore P.F., Mc Connel I.M. (2000). Maturation stages of dendritic cells in canine cutaneous histiocyoma. Vet Dermatol 11 (Suppl.1): 9-10

Balkwill F., Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357: 539-545

Balkwill F. (2002). Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Cytokine Growth Factor Rev 13: 135-141

Banchereau J., Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-252

Bennett S.R.M., Carbone F.R., Karamalis F., Miller J.F.A.P., Heath W.R. (1997). Induktion of a CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. J Exp Med 186: 65-70

Bennett S.R.M., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F.A.P., Heath W.R. (1998). Help for cytotoxic T cell response is mediated by CD40 signaling. *Nature* 393: 478-480

Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E. (2002). The role of macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196 : 254-265

Brunda M.J. (1994). Interleukin-12. *J Leukoc Biol* 55: 280-288

Brunda M.J., Luistro L., Rumennik L., Wright R.B., Dvoroziak M., Aglione A., Wigginton J.M., Wiltout R.H., Hendrask J.A., Palleroni A.V. (1996). Antitumor activity of interleukin12 in preclinical models. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 (Suppl.): 16-21

Burnet F.M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1: 1171-1174

Carbone F.R., Kurts C., Bennett S.R.M, Miller J.F.A.P., Heath W.R. (1998) Cross-presentation. A general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19: 368-372

Carter L.L., Dutton R.W. (1996). Type1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol* 8: 336-342

Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Chu R.M., Lin C.C., Yang S.F., Hsiao Y.W., Hung S.W., Pao H.N., Liao K.W. (2001). Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res* 21: 4017-4024

Cockerell G.L., Slauson D.O. (1979). Patterns of lymphoid infiltrate in the canine cutaneous histiocytoma. *J Comp Pathol* 89: 193-203

- Cohen P.A., Peng L., Plautz G.E., Kim J.A., Weng D.E., Shu S. (2000) CD4+ T cells in adoptive immuotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. *Crit Rev Immunol* 20: 17-56
- Colombo M.P., Trinchieri G. (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunootherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 155-168
- Coussens L.M., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867
- Day M.J., Martin M.W. (2002) Immunohistochemical characterisation of the lesions of canine idiopathic pericarditis. *J Small Anim Pract* 43: 382-7
- De Panfilis G. (2001). Alterations in molecular killing mechanisms: implications in skin disease. *Br J Dermatol* 145: 868-876
- Dinarello C.A. (1998). Interleukin-1 in: Thomson A.W. (ed.), *The cytokine handbook*, Third Edition. Academic Press: 36-72
- Drake C.G., Pardoll D.M. (2002). Tumor immunology – towards a paradigm of reciprocal research. *Semin Cancer Biol* 12: 73-80
- Drommer W., Schulz L.-C. (1969). Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am übertragbaren venerischen Sarkom und Histiozytom des Hundes. *Pathol Vet* 6: 273-286
- Fartatsch M., Vigneswaran N., Diepgen T.L., Hornstein O.P. (1990) Immunohistochemical and ultrastuctural study of histiocytosis x and non-x-histiocytoses. *J Am Acad Dermatol* 23:885-892
- Fehinger T. A., Cooper M. A., Caligiuri M. A. (2002). Interleukin-2 and interleukin-15: immunootherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 169-183
- Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosman T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th 1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451

- Flavell D.J., Jones D.B., Wright D.H. (1987) Identification of tissue histiocytes on paraffin sections by a new monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 35: 1217-1226
- Flanagan K., Kaufman H.L. (2002). Chemokines and cancer. *Cancer Invest* 20: 825-834
- Fontana A., Constan D.B., Frei K., Malipiero U., Pfister H.W. (1992). Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. *Int Arch Allergy Immunol* 99: 1-7
- Foss F.M. (2002). Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 29 (Suppl. 7): 5-11
- Frese K., Durchfeld B., Eskens U. (1989). Klassifikation und biologisches Verhalten der Haut- und Mammatumoren von Hund und Katze. *Prakt Tierarzt* 9: 69-84
- Fujiwara H., Clark S.C., Hamaoka T. (1996). Cellular and molecular mechanisms underlying IL-12 induced tumor regression. *Ann N Y Acad Sci* 795: 294-309
- Fujiwara H., Hamaoka T. (1997). The ant-tumor effects of IL-12 involve enhanced IFN- γ production by anti-tumor T cells , their accumulation to tumor sites and in situ IFN- γ production. *Leukemia* 11 (Suppl 3.): 570-571
- Geisel O. (1987). Biopsische Untersuchungen der Hauttumoren vom Hund. *Tierärztl Umsch* 42: 788-796
- Girolomoni G., Ricciardi-Castagnoli P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapie. *Immunol Today* 18: 102-104
- Gleisler C.A., Raulston G.L., Jardine J.H., Gray K.N. (1979). Malignant fibrous histiocytoma in dogs and cats. *Vet Pathol* 16: 199-208
- Glick A.D., Holscher M., Campbell G.R. (1976). Canine cutaneous histiocytoma: ultrastructural and cytochemical observations. *Vet Pathol* 13 : 374-380

Goldschmitt M.H., Hendrick M.J. (2002). Tumors of the skin and soft tissue In: Meuten D.J. (ed.), Tumors of domestic animals, Fourth Edition, Iowa State Press: 45-117

Gonzales C.M., Griffey S.M., Naydan D.K., Flores E., Cepeda R., Cattaneo G., Madewell B.R. (2000). Canine transmissible venereal tumor: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumors in growth phase and during regression after chemotherapy. J Comp Pathol 122: 241-248

Greene J.F.Jr., Townsend J.S.IV, Amoss M.S.Jr. (1994). Histopathology of regression in sinclair swine model of melanoma. Lab Invest 71: 17-24

Gröne A., Frisk A.-L., Baumgärtner W. (1998). Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. Vet Immunol Immunopathol 65: 11-27

Gröne A., Fonfara S., Markus S., Baumgärtner W. (1999). RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH 82) and canine peripheral blood leukocytes. Zentralblatt Veterinärmed B 45: 301-310

Hart D.N.J. (1997). Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 90: 3245-3287

Hayden D.W., Walters D.J., Burke B.A., Manivel J.C. (1993). Disseminated malignant histiocytosis in a golden retriever: clinicopathologic, ultrastructural and immunohistochemical findings. Vet Pathol 30: 256-264

Heberman R.B. (2002). Cancer immunotherapy with natural killer cells. Semin Oncol 29: 27-30

Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H., Walder E.J. (1998). Histiocytic Tumors in WHO International Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals, Second Series, Vol. II, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.: 29-31

- Hirano T., Akira S., Taga T., Kishimoto T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 11: 443-449
- Hirschberger J. (1987). Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen T-Lymphozyten des Huhnes. *Vet. Med. Diss.*, Gießen
- Hoskin D.W. (2000). TRAIL: a newly described effector mechanism of cytotoxic lymphocytes. *Mod Asp Immunobiol* 1: 136-139
- Hsiao Y.W., Liao K.W., Hung S.W., Chu R.M. (2002) Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 19-27
- Hsu S.M., Raine L., Fanger H. (1981). Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
- Huang A.Y.C., Golumbek P., Ahmadzadeh M., Jaffee E., Pardoll D., Levitsky H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class 1-restricted tumor antigens. *Science* 264: 961-965
- Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A., Lowenstein C., Pardoll D., Levitsky H. (1998). The central role of CD4⁺ T-cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188: 2357-2368
- Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 95-109
- Jacobs R.M., Messik J.B., Valli V.E. (2002). Tumors of the haemolymphatic system (histiocytic proliferativ diseases) in: Meuten D.J. (ed.), *Tumors of Domestic Animals*, Fourth Edition, Iowa State Press: 170-172
- Jenkins D.C., Charles I.G., Thomsen L.L., Moss D.W., Holmes L.S., Baylis S.A., Rhodes P., Westmore K., Emson P.C., Moncada S. (1995). The role of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4392-4396

Kägi D., Vignaux F., Ledermann B., Bürki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H., Golstein P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528-530

Kelly D.F. (1970). Canine cutaneous histiocytoma. A light and electron microscopic study. *Pathol Vet* 7: 12-27

Kelm G. (1982). Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Morphologie und formale Pathogenese des kutanen Histiozytoms des Hundes. *Vet. Med. Diss., Berlin*

Kerlin R.L., Hendrick M.J. (1996). Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog - convergent or divergent phenotypic differentiation? *Vet Pathol* 33: 713-716

Kim J., Modlin R.L., Moy R.L., Dubinett S.M., McHugh T., Nickoloff B.J., Uyemura K. (1995). IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local immune response. *J Immunol* 155: 2240-2247

Kipar A. (1994). Klassifizierung und Dignität der Rundzelltumoren der Haut und kutanen Schleimhaut des Hundes. *Vet. Med. Diss., Giessen*

Kipar A., Baumgärtner W., Kremmer E., Frese K., Weiss E. (1998). Expression of major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 1-13

Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elner V.M., Elner S.G., Strieter R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-1801

Larralde M., Rositto A., Giardelli M., Gatti C.F., Santos Munoz A. (1999). Congenital self-healing histiocytosis (Hashimoto-Pritzker). *Int J Dermatol* 38: 693-696

Le J., Vilcek J. (1987). Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56: 234-248

- Le J., Vilcek J. (1989). Interleukin 6: a multifunktional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 61: 588-602
- Levitsky H. I. (1996) Tumors derived from antigen presenting cells. *Semin Immunol* 8: 281-287
- Long E.O. (2002). Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 12: 57-61
- Marchal T., Dezutter-Dambuyant C., Fournel C., Magnol J.-P., Schmitt D. (1995). Electron microscopic study on canine cutaneous histiocyoma: a benign Langerhans cell tumor. *Dendritic cells in fundamental and clinical immunology*, 2. Series. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 378, Plenum Press, New York: 549-551
- Marchal T., Saint-André I., Magnol J.P., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D. (1995). Les cellules dendritiques du chien et du chat: modèles d' étude en pathologie humaine. *Pathol Biol* 43: 910-920
- Markus S., Failing K., Baumgärtner W. (2002). Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *J Neuroimmunol* 125: 30-41
- Matzinger P. (1994). Tolerance, danger, and the extended familiy. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045
- Mc Intosh J.K., Jablons D.M., Mule J.J., Nordan R.P., Rudikoff S., Lotze M.T., Rosenberg S.A. (1989). In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice. *J Immunol* 143: 162
- Miller J.S. (2002). Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest* 20: 405-419

- Mocellin S., Wang E., Marincola F.M. (2001). Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother* 24: 392-407
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765
- Moore P.F. (1984). Systemic histiocytosis of Bernese mountain dogs. *Vet Pathol* 21: 554-563
- Moore P.F. (1986 a) Characterisation of cytoplasmic lysozym immunoreactivity as a histiocytic marker in normal canine tissue. *Vet Pathol* 23: 763-769
- Moore P.F. (1986 b) Utilization of cytoplasmic lysozym immunoreactivity as a histiocytic marker in canine histiocytic disorders. *Vet Pathol* 23: 757-762
- Moore P.F., Rosin A. (1986). Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs. *Vet Pathol* 23: 1-10
- Moore P.F., Mariassy A.T. (1986). Dendritic (Langerhans) cells in canine epidermis: ultrastructure and distribution. *Anat Histol Embryol* 15: 178-179
- Moore P.F., Schrenzel M.D., Affolter V.K., Olivry T., Naydan D. (1996). Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta 2- integrin molecules. *Am J Pathol* 148: 1699-1708
- Moretta A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissue. *Nat Rev Immunol* 2: 957-964
- Moretta L., Biassoni R., Bottino C., Mingari M.C., Moretta A. (2002). Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 55: 229-232
- Morgan C.D., Measel J.W.Jr., Amoss M.S.Jr., Rao A., Greene J.F.Jr. (1996). Immunophenotypic characterization of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes isolated from melanomatous and non-melanomatous Sinclair miniature swine. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 189-203

- Morris J.S., McInnes E.F., Bostok D.E., Hoather T.M., Dobson J.M. (2002). Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from flat-coated retrievers. *Vet Pathol* 39: 473-479
- Mosmann T.R., Sad S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146
- Moulton J.E. (1961). *Tumors in Domestic Animals*. University of California Press, Berkley and Los Angeles: 32-33
- Mulligan R.M. (1949). *Neoplasms of the dog*. William & Wilkins Company, Baltimore: 93-95
- Munnell J.F. (1986). Langerhans cells in domestic animals. *Anat Histol Embryol* 15: 178-179
- Murphey K.M., Reiner S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2: 933-944
- Nakajima C., Uekusa Y., Iwasaki M., Yamaguchi N., Mukai T., Gao P., Tomura M., Ono S., Tsujimura T., Fujiwara H., Hamaoka T. (2001). A role of interferon- γ (IFN- γ) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN- γ deficient mice. *Cancer Res* 61: 3399-3405
- Nicholls P.K., Stanley M.S. (2000). The immunolgy of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 73: 101-127
- Nicholls P.K., Moore P.F., Anderson D.M., Moore R.A., Parry N.R., Gough G.W., Stanley M.S. (2001). Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology* 283: 31-39
- O'Connel J. (2000). The Fas counterattack: A new perspective on immune evasion by cancers. *Mod Asp Immunobiol* 1: 60-62

Ossendorp F., Toes R.E.M., Offringa R., van der Burg S.H., Melief C.J.M. (2000). Importance of CD4+ T helper cell response in tumor immunity. *Immunol Lett* 74: 75-79

Oxenhandler R.W., Adelstein E.H., Haigh J.P., Hook R.R.Jr., Clark W.H.Jr. (1979). Malignant melanoma in the sinclair miniature swine: an autopsy study of 60 cases. *Am J Pathol* 96: 707-720

Oxenhandler R.W., Berkelhammer J., Smith G.D., Hook R.R.Jr. (1982). Growth and regression of the cutaneous melanomas in sinclair miniature swine. *Am J Pathol* 109: 259-69

Pathak S., Multani A.S., McConkey D.J., Imam A.S., Amoss M.Jr. (2000). Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. *Int J Oncol* 17: 1219-24

Pardoll D. (2001). T cells and tumours. *Nature* 411: 1010-1012

Perez J., Bautista M.J., Rollon E., Chacon-M. de Lara F., Carrasco L., Martin de las Mulas J. (1996a). Immunohistochemical characterization of hemangiopericytoma and other spindle cell tumors in the dog. *Vet Pathol* 33: 391-397

Perez J., Mozos E., Chacon-M. de Lara F., Paniagua J., Day M.J. (1996b). Disseminated aspergillosis in a dog: an immunohistochemical study. *J Comp Pathol* 115: 191-196

Perez J., Day M.J., Mozos E. (1998) Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol* 64: 133-147

Petersen B.L., Rengtved P., Bank M.I., Carstensen H. (2003). High expression of markers of apoptosis in Langerhans cell histiocytosis. *Histopathology* 42: 186-193

Reid C.D.L. (2001). Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br J Haematol* 112: 874-887

- Rodella L., Rezzani R., Zauli G., Mariani A.R., Rizzoli R., Vitale M. (1997). Apoptosis induced by NK cells is modulated by the NK-active cytokines IL-2 and IL-12. *Int Immunol* 10: 719-725
- Roitt I., Brostoff J., Male D. (2001). Tumor Immunology in: *Immunology*, Sixth Edition. Mosby Imprint of Harcourt Publishers Limited: 289-302
- Rosenberg S.A. (2001a). Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 411: 380-384
- Rosenberg S.A. (2001b). Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 250: 462-475
- Sandusky G.E., Carlton W.W., Wightman K.A. (1987). Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet Pathol* 24: 495-499
- Schindler R., Gelfand J.A., Dinarello C.A. (1990). Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 265: 10232-10237
- Scott D.W., Miller W.H.Jr., Griffin C.E. (2001). Neoplastic and Non-Neoplastic Tumors in: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, Sixth Edition. W. B. Saunders Company: 1236-1414
- Seiter S., Marincola F.M. (2000). The multiple ways to tumor tolerance. *Mod Asp Immunobiol* 1: 121-124
- Smith H.A., Jones T.C. (1966). *Veterinary Pathology*, Thrid Edition. Lea & Febinger, Philadelphia: 220-222
- Smyth M.J., Taniguchi M., Street S.E.A. (2000). The anti-tumor activity of IL-12: mechansims of innate immunity that are model and dose dependant. *J Immunol* 165: 2665-2670
- Smyth M.J., Godfrey D.I., Trapani J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapie. *Nat Immunol* 2: 293-299

- Smyth M.J., Takeda K., Hayakawa Y., Peschon J.J., van den Brink M.R., Yagita H. (2003). Nature`s TRAIL – on a path to cancer immunotherapie. *Immunity* 18 (1): 1-6
- Soini Y., Pääkkö P., Letho V.-P. (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 153: 1041- 1053
- Sogn J.A. (1998). Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 9: 757-763
- Strieter R.M. (2001). Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nat Immunol* 2: 285-286
- Taylor D.O.N., Dorn C.R., Luis O.H. (1969). Morphologic and biologic characteristics of the canine cutaneous histiocytoma. *Cancer Res* 29: 83-92
- Titu L.V., Monson J.R.T., Greenman J. (2002). The role of CD8+ T-cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 51: 235-247
- Tizzard I.R. (2000). Resistance to Tumors in: *Veterinary Immunology*, Sixth Edition. W.B. Saunders Company: 295-306
- Todryk S. (2000). Roads that lead to tumor immunotherapy. *Mod Asp Immunobiol* 1: 114-118
- Trinchieri G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146
- Vujanovic N.L. (2001). Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells. *Int Rev Immunol* 20: 415-437
- Wagner S.N., Schultewolter T., Wagner C., Briedigkeit L., Becker J.C., Kwasnicka H.M., Goos M. (1998). Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 78: 541-550
- Walter J.H., Gutberlet K., Schwegler K., Rodolph R. (1997). Vorkommen und Häufigkeit caniner Neoplasien im Sektionsgut. *Kleintierpraxis* 42: 273-284

- Watrach A.M., Small E., Case M.T. (1970) Canine papilloma: progression of oral papilloma to carcinoma. J Natl Cancer Inst 45: 915-920
- Weber T. (1985). Enzymhistochemische Untersuchung am kutanen Histiozytom des Hundes. Vet. Med. Diss., Berlin
- Welle M. (2002). Rundzelltumoren. 7. Schnittseminar der Fachgruppe Pathologie der DVG, 08.-09. März 2002, Fulda
- Wilkock B.P. (1992). The Eye and the Ear in: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (eds.) Pathology of Domestic Animals Fourth Edition. Academic Press Inc., San Diego: 510-511
- Wünschmann A., Alldinger S., Kremmer E., Baumgärtner W. (1999). Identification of CD4+ and CD8+ T-cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. Vet Immunol Immunopathol 67: 101-116
- Wuyts A., Proost P., van Damme J. (1998). Interleukin-8 and other chemokines in: Thomson A.W., The cytokine handbook, Third Edition. Academic Press: 271-311
- Yager J.A., Scott D.W., Willkock B.P. (1992). The Skin and Appendages in: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (eds.) Pathology of Domestic Animals, Fourth Edition. Academic Press Inc., San Diego: 722-727
- Yu W.-G., Ogawa M., Mu J., Umehara K., Tsujimura T., Fujiwara H., Hamaoka T. (1997). IL-12-induced tumor regression correlates with the in situ activity of IFN- γ produced by tumor-infiltrating cells and its secondary induction of anti-tumor pathways. J Leukoc Biol 62: 450-457
- Zouh Y., Bosch M.L., Salgaller M.L. (2002). Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for induction of anti-tumor immunity. J Immunother 25 (4): 289-303

9 ANHANG

9.1 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Advanced Biotechnologies, Hamburg

Superladder-Low (100bp Längenstandard), SLL-100S
6x gel loading buffer

Boeringer Mannheim Biochemica, Mannheim

DNase, Rnase-frei, 776785
Ethidiumbromid, 200271
In Situ Cell Death Detection Kit, AP, 1684809
Proteinase K, 1413783

Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden

Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten BALB/c Mäusen, CL8100
Biotiniliertes Kaninchen-anti-Ratte Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 4000
Biotiniliertes Pferd-anti-Maus Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 2000
Biotiniliertes Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin (Vector Laboratories), BA 1000
Vectastain ABC.Kit, Standard (Vector Laboratories), PK 4000

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

Polyklonal Kaninchen-Anti-Human Lysozym (Muramidase) EC 3.2.1.17. Ig-Fraktion, A0099
Monoklonal Maus-Anti-Human Myeloisches/Histiozytäres Antigen, Klon: MAC387, Isotyp: IgG1, Kappa, Kulturüberstand, M0747
Glycergel Mounting Medium, C563

DCS Innovative Diagnostiksysteme, Hamburg

Fast Red Substrate Pack

Dianova, Hamburg

PAP-Komplex von der Maus, 223005024
Ratte-anti-Maus Immunglobulin, 415035166

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm

Di-Natrium-Ethylendiamino-tetra-Essigsäure(EDTA) puriss. p.a. ACS 03680
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC), purum, 32490
Imidazol puriss. p. a., 56750

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) purum p.a., 32750
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 93352
Isopentan, 59075

Gibco-BRL, Eggstein

Agarose Ultra Pure, 540-5510 UA
Trizol-Reagenz, 15596-0926

Hecht I., Kiel-Hasse

Eukitt® (Corbit-Balsam)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Ribonuklease-Inhibitor E00312

Merck E., Darmstadt

Äthanol (Alkohol) absolut p.a., 972
Borsäure krist. Reinst, 160
Eosin (gelblich), 1345
Hämatoxylin, 4305
Natriumchlorid reinst, 6400
Methanol reinst, 6008
Papanicolau-Lösung 1b, 9254
2-Propanol (Isoproylalkohol) reinst, 8995
Tritrisol® (1N HCl) 1M/l, 9970
Xylol, reinst, 8685

PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Eagles Minimal Essential Medium mit Earle'scher Salzlösung und Glutamin, E15-852

Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

GeneAmp RNA PCR Core Kit, N808 0143

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, 3003230

Roth C., Karlsruhe

Agarose, Rotigarose®, 2267
Ethanol, Rotpuran® >99,7% p.a., 3738
2-Propanol, (Isopropylalkohol) Rotipuran® >99,7% p.a., MW60, 10,6752,1
Formaldehyd 36%ig, 7398.2
Methanol 99,8%ig p.p., 4627

Natriumchlorid, 3957.1
Roti®-Histol, 6640
Trichlormethan/Chloroform, MW 119,38,7331.1

Serva, Heidelberg

Triton® X-100, 37240

Vogel GmbH & Co KG, Gießen

Tissue Tec® O.C.T.-Einbettmittel, LT 45839

9.2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Es sind nur die über eine Laborgrundausrüstung (insbesondere eines Histologielaors) hinausgehenden Geräte aufgeführt:

Bessier, Wiesbaden

Polaroid Film Noir&Blanc A667, Tageslichtfilm

Biozym, Deutschland

Multicycler® PTC 200
Safeseal-Tips bis 1000 µl, 781002
Safeseal-Tips bis 200 µl, 780202
Safeseal-Tips bis 20 µl, 7810027
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, 710910
Gel Bond®-Film, 53748

Consort, Belgien

Mikrocomputer Elektrophoresis Power Supply, E425

Engelbrecht, Edermünde

Star Frost® Objektträger

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Zentrifuge, 5415 C
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 0030 120.086
Reaktionsgefäße 2,0 ml, 0030 120.094

Greiner Labortechnik, Essen

Gewebekulturschalen 35/10 mm, 627160

Heraeus

Laminar Air® LB-48-C

Keutz, Reiskirchen

Flachgel-Elektrophoresekammer Midi, horizontal, 0030191-00

Gießvorrichtung, 0030191-03

Life Sciences (Shandon), Frankfurt

Shandon Sequenza Immunfärbecenter, 73300001-Shandon Varistain

Menzel Gläser, Glasbearbeitungswerke GmbH & Co KG, Braunschweig

Super Frost Plus®-Objekträger, 041300

Olympus, Hamburg

Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10, 034077

Pharmacia Biotech, Freiburg

Spektralphotometer GenQuant 2

Polaroid, Massachusetts, USA

Kamera MP 4

Reichert-Jung GmbH, Nußloch

Krytom Frigocut, Modell 2700

Roche Diagnostics GmbH

Roche LightCycler Instrument

LightCycler Capillaries, 1909339

LightCycler Software Version 3.5

Schleicher & Schuell, Dassel

Papierfilter, 110 mm Durchmesser, 311643

Science Service (SCI), München

Pap-Pen®

Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting

SLG-Qualitäts Laborhandschuhe (Latex), 46221S

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

UV-Transilluminator 312 nm

Vogel Giessen

Tissue-Tec® Eindeckautomat, Modell 4765

9.3 Lösungen und Puffer

9.3.1 Immunhistologie und TUNEL-Methode

0,1 M Imidazol / HCl-Puffer, pH 7,1:

6,81 g Imidazol in 1000 ml Aqua dest lösen und ca. 500 ml 0,1 M HCl zufügen bis pH 7,1 eingestellt ist

Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Lösung (DAB):

100mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), anschließend filtrieren und 70µl H₂O₂ (30%ig) zugeben.

0,5%iges H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte:

1,5 ml 30%iges H₂O₂ in 100ml Methanol geben

0,03%iges H₂O₂ in TBS für Paraffinschnitte:

90µl 30%iges H₂O₂ in 100 ml TBS geben

Tris-Puffer-Stammlösung („tris bufferd saline“, TBS), pH 7,6:

60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 610 ml Aqua dest. lösen und ca. 390 ml 1N HCl (Titrisol®) zufügen bis pH-Wert 7,6 eingestellt ist. Für die Gebrauchslösung 100 ml Stammlösung mit 0,8%iger NaCl in Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Papanicolaou Lösung:

Papanicolaou-Lösung und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung („phosphate buffered saline“, PBS)

21,76 g Natriumchlorid, kristallin

3,592 g Natriumhydrogen-Phosphat p.a.

0,544 g Kaliumhydrogenphosphat p.a., in 420 ml Aqua dest. Lösen

Protease Behandlung

0,03 g Protease in 60ml vorgewärmtes NaCl-PBS (37°C) geben

9.3.2 RNA-Isolierung und RT-PCR

Aqua bidest., Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt

1 ml DEPC-Reinsubstanz ad 1000ml Aqua bidest.

Schütteln bis es gelöst ist, über Nacht auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur unter einem Abzug stehen lassen, danach autoklavieren

2%iges Agarosegel (104,3 cm³)

1,82 g Agarose in 91ml Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle lösen, auf ca. 64°C erkalten lassen, 1,6µl Ethidiumbromid zufügen, in Gießvorrichtung geben und erstarren lassen

0,5 M EDTA-Na₂, pH 8,0:

18,6 g di-Natrium-EDTA-dihydrat (MW 372,31; entspricht 4,6 g EDTA) in 60 ml Aqua bidest/DEPC lösen, pH 8,0 mit 5M NaOH einstellen, auf 100ml auffüllen und autoklavieren

Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)

0,2 g Ethidiumbromid (MW 394,3) ad 20 ml Aqua bidest, gut schütteln, Licht geschützt lagern

10x TBE-Elektrophoresepuffer

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83), 40,0 ml 0,5M EDTA-Na₂ (pH8,0)

ad 100ml Aqua dest, autoklavieren (zur Herstellung der Gebrauchslösung 100ml 10x TBE-Puffer und 900 ml Aqua bidest mischen)

9.4 Abkürzungen

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AS	Antisense
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ADCC	Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
CD3 ϵ	CD3 ϵ -Antigen
CD4	CD4-Antigen
CD8	CD8-Antigen
CD21(like)	CD21(like)-Antigen
cDNA	komplementäre DNA
Con A	Concanavalin A
CTL	zytotoxische T-Zelle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymintriphosphat
d.h.	das heißt
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FAS	Rezeptor CD95 (Apolipoprotein 1)
g	gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
IH	Immunhistologie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
Ig	Immunglobulin
J	Jahre
Kap.	Kapitel
L	Liter
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
m	männlich
M/mM	Molarität (molar/millimolar)
MEME	Eagle`s Minimal Essential Medium mit Earlscher Salzlösung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
N, n	Anzahl
n.b.	nicht bekannt
n.d.	nicht durchgeführt
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
P	Primer
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S.	Seite
S	„Sense“
T	Thymin
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzelle
TIM	Tumor-infiltrierender Makrophage
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumor-Nekrosefaktor

TRAIL	„TNF related apoptosis inducing ligand“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TUNEL	„terminale desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling“
U	Uracil
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Herrn HDoz. Dr. A. Moritz und Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D. möchte ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. E.-G. Grünbaum danke ich für die freundliche Aufnahme in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik und Prof Dr. Dr. h.c. E. Weiss und Prof. Dr. M. Reinacher für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Pathologie.

Mein herzlicher Dank gilt den Tierärztinnen und Tierärzten, von denen ich die unfixierten Histiocytoome erhalten haben. Besonders möchte ich Dr. U. Meyer, Dr. A. Lemmer, Dr. H. Menzel und deren Mitarbeitern, die den Großteil meiner Histiocytoom-Sammlung gestellt haben, für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Dem ganzen Team der Veterinär-Pathologie danke ich für die schöne Zeit am Institut, Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor und in der Halle und für den Spaß bei der Arbeit und außerhalb der Arbeitszeit.

Vielen Dank an Annette für die Hilfe bei der Immunhistologie und an Sonja, Anna-Lena und Steff für die Einarbeitung in Labortechniken.

Bei Frau Zeller und Frau Behrens möchte ich mich für die fotografischen Arbeiten bedanken.

Ich danke den Mitarbeitern der „Inneren Kleintier“ für den Einblick in die Klinik und das nette Arbeitsklima.

Herrn Dr. K Failing und Herrn H. Heiter danke ich für ihre großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Ich danke allen, die im Rahmen der Pathologie-Ausbildung ihr Wissen weitergeben.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ möchte ich für die interessante Ausbildung und die finanzielle Unterstützung danken. Den anderen „Graduierten“ danke ich für die gute Stimmung in unserer Gruppe.

Den Mitarbeitern der Pathologie in Hannover möchte ich für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit während des schriftlichen Teils dieser Arbeit danken.

Vielen Dank und alles Liebe an meine Familie und Jan, die immer für mich da sind !